

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-
Krankenhauses, Berlin-Tempelhof
Direktor: Professor Dr.med. Wolfdietrich G e r m e r

Untersuchungen über die kombinierte Anwendung
eines RNS-Inhibitors und eines Proteininhibitors
auf die Frühphase der Virusreproduktion von
Vesikularstomatitis-Virus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frank-Peter S c h e l p
aus Berlin

1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-
Krankenhauses, Berlin-Tempelhof

Direktor: Professor Dr.med. Wolfdietrich G e r m e r

Untersuchungen über die kombinierte Anwendung
eines RNS-Inhibitors und eines Proteininhibitors
auf die Frühphase der Virusreproduktion von
Vesikularstomatitis-Virus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frank-Peter S c h e l p
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Priv.Doiz.Dr.med. Wolfgang D i e f e n t h a l
Korreferent: Professor Dr.med. Bernhard S c h m i d t



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. Juni 1968

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	3
II. <u>Material und Methodik</u>	5
III. <u>Ergebnisse</u>	9
A Untersuchungen der Hemmwirkung von AzaUracil auf die Reproduktion von RNS-Viren und die RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen	9
1) Die Wirkung von AzaUracil auf die Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus und der toxische Effekt des Inhibitors	9
2) Die Wirkung von AzaUracil auf die Synthese von Ribonukleinsäure verschiedener nicht-infizierter Zellstämme	10
3) Die Auswirkung von AzaUridin auf die RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen	21
B Hemmung der RNS-Synthese durch AzaUracil bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese	21
1) Die Auswirkung von Puromycin auf die RNS-Synthese	23
2) Die Auswirkung einer Kombination von AzaUracil und aminosäurefreiem Nährmedium auf die RNS-Synthese	23
C Der Einfluß von Inhibitoren der RNS- und der Proteinsynthese auf die frühe Phase der Virusreproduktion	23
D Einfluß der Inhibitoren der RNS- und Proteinsynthese auf die Proteinsynthese nicht-infizierter Zellen	32

	<u>Seite</u>
IV. <u>Diskussion</u>	35
A Inhibitoren	35
1) Wirkungsmechanismus von Puromycin	35
2) Wirkungsmechanismus von AzaUracil	38
B Protein- und RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen	42
1) Abhängigkeit der RNS-Synthese von der Proteinsynthese	42
2) Chloramphenicol-RNS	43
3) Abhängigkeit der Proteinsynthese von der RNS-Synthese	45
C Untersuchungen in der frühen Phase der Virusreproduktion	46
1) Virusnukleinsäure als Überträgersubstanz der genetischen Information	46
2) Umstellung des Zellstoffwechsels nach Infektion	47
3) Enzyme der Virus-RNS-Synthese	48
4) Die "replicative form"	49
5) Die Virusproteinsynthese	51
6) Einfluß von Puromycin und AzaUracil auf die frühe Phase der Virusreproduktion	52
a) Die Hemmwirkung von AzaUracil auf die frühe Phase der Virusreproduktion	53
b) Die Hemmwirkung von Puromycin auf die frühe Phase der Virusreproduktion	54
c) Kombinierte Anwendung von Puromycin und AzaUracil	54
V. <u>Zusammenfassung</u>	57
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	58

EINLEITUNG

Zur Zellteilung kommt es nach Ablauf einer Vielzahl von biochemischen Stoffwechselvorgängen. Viren dagegen haben keinen eigenen Stoffwechsel; sie können sich daher nicht aus sich heraus vermehren. Die Vermehrung von Viren kann nur in lebenden Zellen stattfinden. Hierbei dringt das genetische Material des Virus, die Nukleinsäure, in die Zelle ein. Diese stellt den Stoffwechsel der Zelle derart um, daß nunmehr vornehmlich solche Synthesevorgänge ablaufen, die für die Neubildung von Viruspartikeln notwendig sind. Dabei werden zum Teil Enzymsysteme und Zellstrukturen verwendet, die auch zelleigenen Synthesevorgängen dienen. Darüber hinaus werden in der Virus-infizierten Zelle neue Enzymsysteme gebildet, die ausschließlich Vorgänge der Virusproduktion katalysieren. Dabei laufen eine Vielzahl von funktionell zusammengehörigen Synthesevorgängen konsekutiv ab. Von besonderer Bedeutung sind Vorgänge der Protein- und Nukleinsäuresynthese. Proteine mit enzymatischer Funktion werden vor allem während der ersten Zeit nach Infektion der Zelle gebildet. Diese Enzyme ermöglichen erst die Reduplikation der Virusnukleinsäure und die Bildung von Hülleneiweiß für neue Viruspartikel.

Die biochemischen Vorgänge der Virusproduktion lassen sich einerseits direkt nachweisen, andererseits können durch Anwendung bestimmter Stoffwechselinhibitoren definierte Synthesevorgänge blockiert werden. Hieraus lassen sich Hinweise erhalten auf den Ablauf der Virusreproduktion und auf die biochemischen Vorgänge, die für die Neubildung von Viren erforderlich sind. So kann durch Inhibitoren der Proteinsynthese der Ablauf des Virusreproduktionszyklus aufgehalten werden. Dies beruht darauf, daß die Bildung von Proteinen mit enzymatischer Funktion der sogenannten "Frühenzyme" verhindert wird.

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß der erste Zeitabschnitt zu Beginn des Reproduktionszyklus durch Inhibitoren der Protein-

synthese nicht gehemmt wird, somit resistent ist gegenüber diesen Inhibitoren. Die Dauer dieses Zeitabschnittes ist dabei abhängig von der Konzentration des Inhibitors. Erst bei höchsten Substanzkonzentrationen, die zu einer völligen Hemmung der Proteinsynthese führen, werden auch die Vorgänge der Virusreproduktion vollständig blockiert, es kommt somit nicht zur Ausbildung einer resistenten Periode (DIEFENTHAL et al. (1965), (1967)). Andererseits ist nachgewiesen worden, daß die Bildung von enzymatisch wirksamen Frühproteinen, schon durch Inhibitorkonzentrationen verhindert wird, bei denen es noch zur Ausbildung einer resistenten Periode in der Frühphase des Virusreproduktionszyklus kommt.

Auf Grund dieser gegensätzlichen Befunde ergibt sich die Frage, ob während der gegen Proteininhibitoren resistenten Periode noch Vorgänge der Nukleinsäuresynthese ablaufen. Es wurde deshalb der Einfluß des Antimetaboliten AzaUracil auf diesen Zeitabschnitt der Reproduktion von RNS-Viren untersucht. Die Hemmung der RNS-Synthese durch AzaUracil erfordert darüber hinaus die Untersuchung der Zusammenhänge von Protein- und RNS-Synthese in infizierten und in nicht-infizierten Zellen.

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit zu prüfen, ob die Dauer der gegen Inhibitoren der Proteinsynthese resistenten Periode durch gleichzeitige Anwendung von AzaUracil beeinflusst werden kann.

MATERIAL UND METHODIK

Virus

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Indiana Stamm des Vesicularstomatitis-Virus (VSV) durchgeführt. Der Stamm wurde mit Hühnerfibroblasten in Rouxflaschen angezüchtet.

Als Nährlösung diente Eagle-Medium mit 5 % Kälberserum. Innerhalb einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37° C trat ein kompletter cytopathischer Effekt auf. Zur Gewinnung des Virus wurde das überstehende Nährmedium abgefüllt. Um die Zellreste zu entfernen, wurde die Gewebekulturflüssigkeit mit 2000 Upm 10 Minuten zentrifugiert und als Stammvirus bei -70° C eingefroren.

Der Virustiter betrug im Mittel 1×10^8 Plaque bildende Einheiten (PFU) pro ml.

Gewebekulturen

Zu den Experimenten dieser Arbeit wurden Hühnerfibroblasten oder permanente Zellstämme herangezogen.

a) Hühnerfibroblasten

Hühnereier wurden 10 Tage bebrütet. Dann wurden die Embryonen herausgenommen und Gehirn, Eingeweide und Augen entfernt. Anschließend wurden die Embryonen mit einer Schere fein zerschnitten und in 0,2 %iger Trypsinlösung (Trypsin 1:300 (NBCo)) in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) nach DULBECCO et al. (1954) 10 Minuten lang bei 37° C auf dem Magnetrührer inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Hierdurch sollten noch anhaftendes Blut und zerstörte Zellen entfernt werden. In frischer Trypsinlösung wurden die Gewebsstücke durch kräftiges Pipettieren in kleinere Zellkomplexe aufgeschlossen und weitere 25 Minuten auf dem Magnetrührer bei 37° C inkubiert. Danach waren die Gewebsstücke weitgehend in kleine Zellkomplexe aufgeschlossen. Noch verbliebene größere Gewebsstücke wurden nochmals pipettiert. Zur Abtrennung noch vorhandener größerer Gewebsstücke wurde durch eine zweifache Mullage filtriert.

Zur Unterbrechung der Trypsinwirkung wurde das Filtrat in Eiswasser gekühlt. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 500 Upm abgetrennt und der Überstand verworfen.

Die Menge des Nährmediums wurde so gewählt, daß eine 1 %ige Zellsuspension entstand, welche auf Plastikpetrischalen der Firma FALCON Plastics (Los Angeles 45, California, USA) verteilt wurde.

Zur Anzüchtung der Zellen wurden die Petrischalen zwei Tage lang in abgeschlossenen Gefäßen bei 37° C, 5 % CO₂ in Luft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % (DIEFENTHAL et al. (1962)) gehalten. Nach zwei Tagen war ein gleichmäßiger Zellrasen ausgewachsen.

b) Permanente Zellstämme

Es wurden folgende permanente Zellstämme verwendet: FL, HEP-2, HeLa, KB.

Die Stämme wurden in Rouxflaschen gezüchtet und jeden zweiten Tag passagiert.

Bei der Passage wurden die Zellen von dem Glas der Rouxflasche mittels einer 0,2 %igen Trypsinlösung abgedaut, die Versen (Äthylendiamintetraessigsäure) in einer Endkonzentration von 2,5 % enthielt. Hierauf wurde die Trypsin-Zell-Suspension 5 Minuten mit 600 Upm zentrifugiert und danach in frischem Nährmedium mit 20 % Kälberserum durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 in neue Rouxflaschen bzw. Petrischalen gegeben. 1 bis 2 Tage nach der Passage waren die Zellen zu einer einschichtigen Zelllage ausgewachsen und konnten für Versuche verwendet werden.

Deckglasmethode

Für die Inkorporationsversuche wurde die Deckglasmethode (BALTIMORE et al. (1962 a)) angewandt.

Auf Deckgläsern von 26 mm Durchmesser, die in Petrischalen eingelegt waren, wurde entsprechend den jeweiligen Versuchen Zellkulturen in der oben beschriebenen Weise angezüchtet. Nach zwei Tagen wurde das zur Anzüchtung benutzte Medium abgesaugt, die Kulturen 3 x mit 3 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und dann das jeweils für den einzelnen Versuch verwendete Medium zur Vorbehandlung aufgegeben. Die auf diese Weise behandelten Zellen wurden 2 Stunden bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit belassen. Danach wurde das zur Vorbehandlung verwendete Medium abgesaugt und die bei den einzelnen Experimenten angeführte, radioaktiv markierte Substanz in 0,2 ml des jeweilig angewandten Mediums pro Gewebekultur aufpipettiert und 30 Minuten unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Deckgläser aus den Petrischalen entnommen und sofort in eiskalte 5 %ige Trichloressigsäure (TCA) eingelegt. Eine weitere Inkorporation radioaktiv markierter Substanz war nun nicht mehr möglich. Gleichzeitig bewirkte die TCA die Trennung der säurelöslichen von der säureunlöslichen Fraktion. Eine halbe Stunde verblieben die Deckgläser in der kalten TCA. Anschließend wurde die säurelösliche Fraktion durch gründliches Waschen mit kalter TCA entfernt, die Präparate danach getrocknet und in Aluminiumschälchen eingeklebt.

Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der markierten Substanzen wurde im Methan-durchflußzähler der Firma Friessecke & Hoepfner gemessen. Die Angaben in den Tabellen sind auf Impulse pro Minute umgerechnet worden.

Nährmedium und Lösungen

PBS: Phosphat gepufferte Salzlösung nach DULBECCO et al.(1954).

Zur Anzüchtung der Zellkulturen wurde Eagle-Medium der Firma General Biochemicals verwendet, dem 10 % Kälberserum zugesetzt wurde.

Für die Versuche wurden entweder Earle'sches Medium verwendet, oder Eagle's minimal essential medium (Eagle (1955)). Eagle's minimal essential medium in Pulverform (mit nicht-essentiellen Aminosäuren und Glutamin) wurde in Quarz destillierten Aquatri-dist aufgelöst, und mit 1,8 g NaHCO_3 /1000 ml auf ein pH von 7,2 eingestellt. Antibiotika wurden in Endkonzentrationen von 50 E Penicillin, 50 E Streptomycin und 25 I.E. Moronal pro ml Nährmedium zugefügt. Die Sterilisation der Medien erfolgte mittels Filtration durch Millipore Filter.

Plaquetitration

Gut ausgewachsene Hühnerfibroblasten in Plastik-Petrischalen wurden mit je 0,3 ml des in Zehnerpotenzen verdünnten Virus inokuliert, dabei wurden jeweils zwei Petrischalen je Verdünnungsstufe verwendet. Die Virusadsorptionszeit betrug eine Stunde bei 37° C in 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Hierauf wurde die Inokulationsflüssigkeit abgesaugt und auf die infizierten Zellkulturen ein Eagle-Medium gegeben, dem Agar (Difco agar purified) in 0,7 % Endkonzentration zugesetzt worden war. Die Kulturen wurden danach zwei Tage bei 37° C in 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit belassen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 1:5000 in PBS verdünnten Neutralrotlösung angefärbt. Drei Stunden danach hatten die nicht abgestorbenen Zellen Farbstoff aufgenommen, die in Folge der Viruseinwirkung abgestorbenen Zellbereiche dagegen waren ungefärbt geblieben und somit als Plaque erkennbar.

Chemische Substanzen

Puromycin dihydrochloride von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio (USA).

6-AzaUracil von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, (USA), Serva, Heidelberg, Römerstr. 118 (Deutschland), Schwarz Bio Research, Inc., Orangeburg, N.Y.(USA). In der Wirksamkeit der Substanzen der Herstellerfirmen konnte kein Unterschied beobachtet werden.

6-AzaUridin von Schwarz Bio Research, Inc., Orangeburg, N.Y., (USA).

Das AzaUracil bzw. AzaUridin wurde in angewärmten Eagle-Medium gelöst. Da hierbei zunächst ein pH-Umschlag in stark saure Bereiche erfolgte, wurde durch Zugabe von Tris-Puffer in Substanz auf pH 7,2 eingestellt; im Zuge dieser Neutralisation konnte das AzaUracil bzw. AzaUridin in Lösung gebracht werden.

DNase von Serva, Heidelberg, Römerstr. 118 (Deutschland) und Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio (USA) In der Wirksamkeit der Substanzen der Herstellerfirmen konnte kein Unterschied beobachtet werden.

RNase von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, (USA).

DNase und RNase wurden in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

Uracil-2-C14 von Amersham, Buckinghamshire, England, Spez. Aktivität 40.6 mc/mM. Es wurde in allen Versuchen 1 μCi pro Petrischale Uracil-2-C14 aufgegeben. Lediglich bei dem in Abb. 2 dargestellten Versuch wurden 2 μCi /Petrischale verwendet.

Uridin-2-C14 von Schwarz Bio Research, Inc., Orangeburg, N.Y. (USA). Spez. Aktivität 26.7 mc/mM. Es wurden in allen Versuchen 1 μCi /Petrischale Uridin-2-C14 aufgegeben. Lediglich bei dem in Abb. 8 dargestellten Versuch wurden 1,5 μCi /Petrischale verwendet.

Adenin-8-C14 von Schwarz Bio Research, Inc., Orangeburg, N.Y. (USA). Spez. Aktivität 45 mc/mM. Es wurden 1 μCi /Petrischale aufgegeben.

Valin-1-C14 von New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts, (USA). Spez. Aktivität 15 mc/mM. Es wurden 1 μCi /Petrischale aufgegeben.

ERGEBNISSE

A Untersuchungen der Hemmwirkung von AzaUracil auf die Reproduktion von RNS-Viren und die RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen

In Vorversuchen sollte geklärt werden, ob AzaUracil die Reproduktion von RNS-Viren beeinflusst und welche Inhibitorkonzentrationen gegebenenfalls hierfür erforderlich sind. Weiterhin wurde geprüft, ob und in welchen Konzentrationen die Synthese von Ribonukleinsäure in normalen, nicht-infizierten Zellen durch AzaUracil gehemmt wird. Schließlich blieb zu untersuchen, wieweit die Zellen durch wirksame AzaUracilkonzentrationen toxisch geschädigt werden.

1) Die Wirkung von AzaUracil auf die Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus und der toxische Effekt des Inhibitors.

Es wurden Gewebekulturen von Hühnerfibroblasten verwendet. Das AzaUracil wurde in einer Konzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ aufgelöst und durch Zugabe von Eagle-Nährmedium zwei identische Versuchsreihen vergleichsweise angesetzt. Eine Versuchsreihe wurde nicht infiziert, um den toxischen Effekt des AzaUracils auf die Gewebekulturen beurteilen zu können. Das inhibitorhaltige Nährmedium wirkte 22,5 Stunden auf die Zellen ein. Auf der anderen Versuchsreihe verblieb das AzaUracilhaltige Eagle-Nährmedium zunächst eine Stunde zur Vorbehandlung auf den Kulturen. Danach erfolgte die Infektion mit Vesikularstomatitis-Virus in inhibitorhaltigem Medium. Nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde wurde das bis dahin nicht adsorbierte Virus durch Waschen entfernt. Als Waschflüssigkeit diente inhibitorhaltiges Nährmedium in den jeweils erforderlichen Konzentrationen. Danach verblieb das AzaUracilhaltige Nährmedium bis zu 21,5 Stunden auf den Kulturen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Kulturmedium für die Virustitration abgefüllt, und die Zellen der nicht-infizierten Versuchsreihe auf eine Inhibitor bedingte Schädigung hin geprüft.

Der durch das Vesikularstomatitis-Virus verursachte cytopathische Effekt kann durch AzaUracil Konzentrationen von

$7 \times 10^{-2}M$ bis $9 \times 10^{-2}M$ verhindert werden. Geringere Konzentrationen von AzaUracil vermögen nicht das virusbedingte Auftreten der cytopathischen Zellveränderungen zu hemmen. Bei den vergleichsweise nicht-infizierten Gewebekulturen tritt bei Konzentrationen von $9 \times 10^{-2}M$ bzw. $7 \times 10^{-2}M$ AzaUracil eine geringe Schädigung der Gewebekulturzellen ein: Die Zellkerne werden pyknotisch oder unterliegen einer Karyolyse. Die Zellen selbst runden sich ab. Zum Teil führt die Schädigung des Cytoplasmas dazu, daß die Haftfähigkeit der Zellen am Glas des Kulturgefäßes nachläßt. Die Zellen lösen sich und schwimmen dann frei im Kulturmedium. Geringere Konzentrationen von AzaUracil haben auf die Zellen keine Wirkung. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die toxischen Veränderungen der hohen AzaUracil-Konzentrationen im Ausmaß wesentlich geringer sind, als die cytopathischen Veränderungen der Zellen durch das Vesikularstomatitis-Virus.

Die Wirkung von AzaUracil auf die Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus ist in der Abbildung 1 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß eine deutliche Hemmwirkung der Virusreproduktion erst durch Konzentrationen oberhalb $5 \times 10^{-2}M$ erreicht wird. Bei Konzentrationen von $9 \times 10^{-2}M$ wird die Reproduktion des Virus um $2 \log 10$, somit um 99 % gehemmt.

2) Die Wirkung von AzaUracil auf die Synthese von Ribonukleinsäure verschiedener nicht-infizierter Zellstämme

Die Inkorporationsversuche wurden nach der Deckglasmethode (BALTIMORE et al. (1962 a)) durchgeführt. Sie ist im allgemeinen Teil der Methodik beschrieben.

Zunächst wurden Gewebekulturen von KB-Zellen verwendet, die zwei Tage nach der Passage in den Petrischalen zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren. Die Hemmsubstanz AzaUracil wurde in Eagle-Medium aufgelöst. Diesem war Thyminidin in einer Konzentration von $10^{-4}M$ zugesetzt. Dieser Zusatz sollte verhindern, daß Uracil-2-C¹⁴ bzw. Uridin-2-C¹⁴ zu Cytosin bzw. Cytidin transmethyliert und auch in die DNS eingebaut wird. AzaUracil wurde zunächst in einer Konzentration von $10^{-1}M$ in Eagle-Medium unter Zusatz der ange-

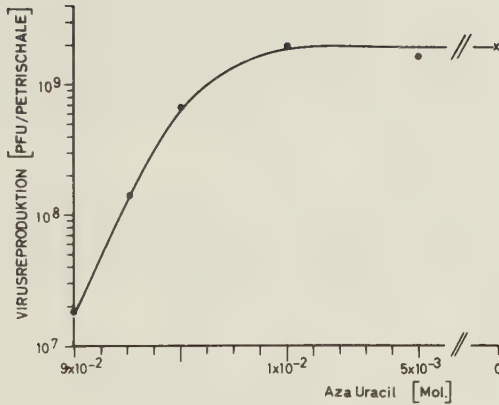


Abb. 1 Hemmung der Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten durch AzaUracil. Vorbehandlung der Zellen mit AzaUracilhaltigen Eagle-Nährmedium 1 Stunde, danach Virusinfektion der Kulturen. Nach einstündiger Absorptionszeit wurde bis dahin nicht absorbiertes Virus durch Waschen mit inhibitorhaltigen Nährmedium entfernt und AzaUracilhaltiges Nährmedium bis zu 21,5 Stunden auf den Zellen belassen. - Deutliche Hemmung der Virusreproduktion durch Konzentrationen von mehr als $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ AzaUracil. 99% Inhibition der Virusreproduktion durch $9 \times 10^{-2} \text{ M}$ AzaUracil.

gegebenen Thymidin-Konzentration aufgelöst und hiervon eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Um das zur Anzüchtung verwendete Nährmedium gründlich zu entfernen, wurden die Gewebekulturen mit je 3 ml physiolog. NaCl dreimal gewaschen. Während zwei Stunden erfolgte die Vorbehandlung der Gewebekulturzellen mit den angegebenen Konzentrationen des AzaUracils. Damit sollte erreicht werden, daß die Stoffwechselvorgänge bei Versuchsbeginn bereits weitgehend dem Inhibitoreinfluß unterliegen. Bei vergleichsweise durchgeführten Experimenten wurde einmal Uridin-2-C¹⁴ und das andere Mal Uracil-2-C¹⁴ den verschiedenen Konzentrationen des AzaUracils zugesetzt. 30 Minuten nach Zugabe der markierten Vorstufen wurden die Deckgläser den Petrischalen entnommen und sofort in eiskalte 5 % Trichloressigsäure (TCA) eingelegt.

In Vorversuchen hat sich erwiesen, daß die Behandlung der Gewebekulturzellen mit DNase nicht erforderlich ist, da die Inkorporation von Radioaktivität in die DNS unter den genannten Versuchsbedingungen praktisch zu vernachlässigen ist. (DIEFENTHAL, persönl. Mitteilung).

Die Versuchsreihe, bei der der Einbau von Uracil-2-C¹⁴ in die säure-unlösliche Fraktion als Maß der RNS-Synthese verwendet wurde, ist in Abb. 2 dargestellt. Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Inkorporation von radioaktiv markiertem Uracil ist ersichtlich. Unter den hier durchgeführten Versuchsbedingungen setzt eine Hemmung der RNS-Synthese bei Konzentrationen von $3 \times 10^{-2}M$ ein. Bei einer Konzentration von $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil wird die Inkorporation von radioaktiv markierten Uracil um 95 % gehemmt. Dieses Versuchsergebnis entspricht in etwa dem Resultat des Experimentes, in welchem die Hemmung des Inhibitors auf die Virusreproduktion untersucht worden war (Abb. 1).

Im Folgenden wurden ähnliche Versuche auf verschiedenen anderen Zellarten durchgeführt, um zu prüfen, ob sich bestimmte Zellkulturen besonders gut oder besonders schlecht für Experimente mit AzaUracil eignen. Verwendung fanden FL-Zellen, HEp-2 Zellen und Hühnerfibroblasten. Die Ergebnisse, die bei diesen Experimenten erzielt wurden (Abb. 3 bis 7) entsprechen im wesentlichen den mit KB-Zellen erhaltenen Ergebnissen. (Abb. 2 und 8).

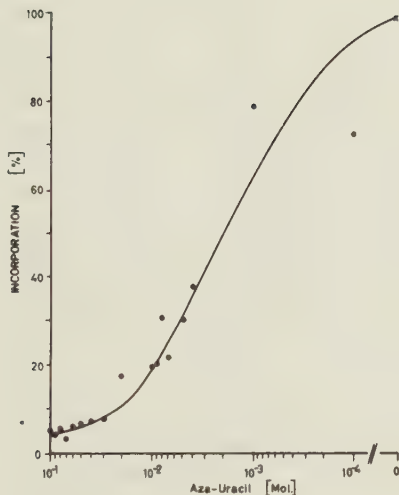


Abb. 2 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in nicht-infizierten Kulturen von KB-Zellen. Gewebekulturzellen wurden 2 Stunden mit AzaUracil in Konzentrationen von $10^{-1}M$ bis $10^{-4}M$ vorbehandelt. 30 Minuten Pulsdauer mit Uracil-2-C¹⁴, das den verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors zugesetzt wurde. Danach sofortige Unterbrechung der Inkorporation der radioaktiv markierten Substanz mit eiskalter 5 % Trichloressigsäure. Messung der Inkorporation von Uracil-2-C¹⁴ in Gewebekulturzellen. - Beginn der Inkorporationshemmung bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-2}M$ AzaUracil. 95 % Inhibition vom Maximum (x) der Inkorporation durch $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil.

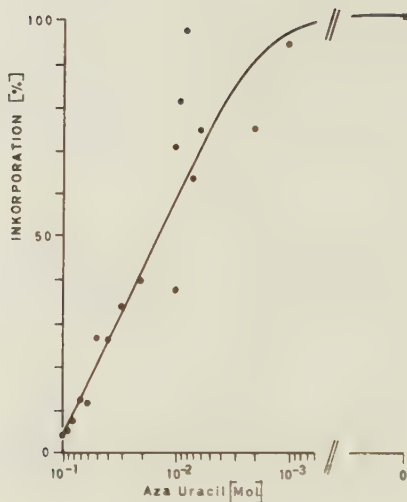


Abb. 3 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in nicht-infizierten Kulturen von FL-Zellen. Nach Unterbrechung der Inkorporation von Adenin-8-C14 in die Gewebekulturzellen wurden die Kulturen fixiert. Nach Entfernung des Fixiermittels und 30 Minuten Elution mit Wasser, 30 minütige Behandlung der Zellen mit 200 μ g/ml DNase. Auswaschung der säure-löslichen Fraktion mit kalter 5 % Trichloressigsäure. Messung des in der RNS-Fraktion der Gewebekulturzellen verbliebenen Adenin-8-C14. - Bei Konzentration von 3×10^{-2} M AzaUracil Beginn der Inkorporationshemmung. 95 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch 9×10^{-2} M AzaUracil.

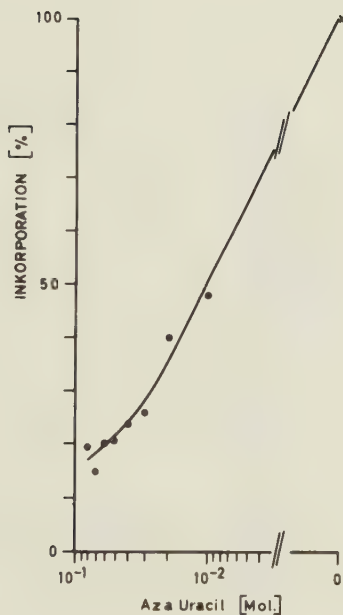


Abb. 4 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in Kulturen von FL-Zellen. Gemessen wurde die Inkorporation von Uracil-2-C14. - Ca. 90 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch $8 \times 10^{-2} \text{M}$ AzaUracil.

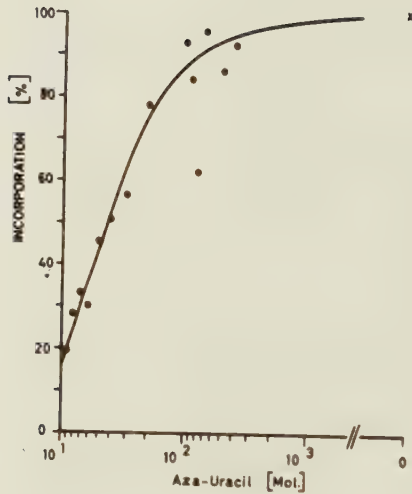


Abb. 5 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in Kulturen von HEP -2 Zellen. Gemessen wurde die Inkorporation von radioaktiv markiertem Uridin-2-C14. - 80 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch 9×10^{-2} M AzaUracil.

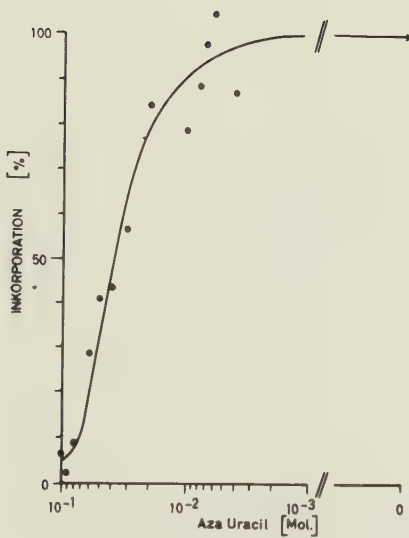


Abb. 6 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. Gemessen wurde die Inkorporation von radioaktiv markiertem Uridin-2-C14. - 95 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch 9×10^{-2} M AzaUracil.

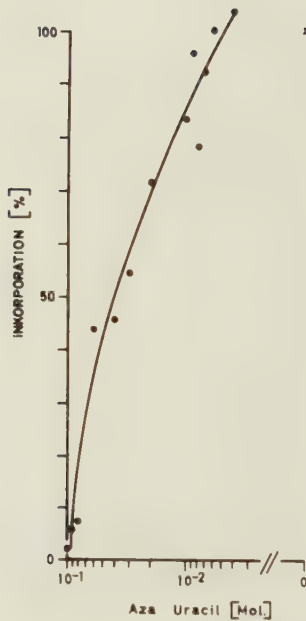


Abb. 7 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. Die Gewebekulturzellen wurden in amino-säurefreien Nährmedium angezüchtet, das auch bei der Durchführung des Experimentes verwendet wurde. Gemessen wurde die Inkorporation von radioaktiv markierten Uridin-2-C14. - 98 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch 10^{-1} M AzaUracil.

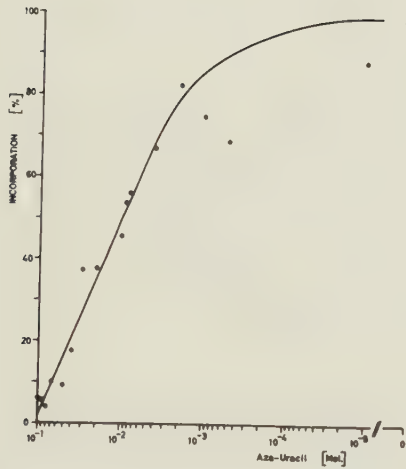


Abb. 8 Hemmung der Synthese von Ribonukleinsäure durch AzaUracil in Kulturen von KB-Zellen. Gemessen wurde die Inkorporation von radioaktiv markiertem Uridin-2-C14. - 95 % Hemmung der Inkorporation vom Maximum (x) durch 10⁻¹M AzaUracil.

Im Konzentrationsbereich zwischen $3 \times 10^{-2}M$ und $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil findet sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Inkorporation der radioaktiv markierten Vorstufe in die RNS der Zelle. Zusammenfassend für diese Experimente ist festzustellen, daß bei der Konzentration $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil eine etwa 90 % - 95 %ige Hemmung erzielt werden kann.

Neben Uracil-2-C¹⁴ wurde die Inkorporation von Uridin-2-C¹⁴ als Maß für die RNS-Synthese verwendet. Ein Vergleich der Abb.2 und 4 mit den Abb. 5, 6, 7 und 8 zeigt, daß kein wesentlicher Unterschied in der Wirkung des Inhibitors auf die beiden zur Messung verwendeten Substanzen besteht.

Es ergab sich die Frage, ob die hierbei beobachtete Hemmung des Einbaus der radioaktiv markierten Vorstufen in die RNS a) auf der kompetitiven Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase beruht oder b) eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Uracils von der RNS-Synthese durch AzaUracil stattfindet. In einem Vergleichsexperiment wurde deshalb eine radioaktiv markierte Purinbase, das Adenin-8-C¹⁴, zur Messung der RNS-Synthese verwendet.

Dieser Versuch wurde im wesentlichen in der gleichen Weise durchgeführt wie bereits oben beschrieben. Da jedoch unter diesen Bedingungen die Inkorporation der radioaktiv markierten Vorstufe sowohl in die RNS als auch in die DNS-Fraktion der Zelle erfolgt, wurden diese Gewebekulturen mit DNase behandelt. Dieser Fermentbehandlung ging die Fixierung der Kulturen in einem Gemisch aus 50 Teilen Alkohol, 50 Teilen Äther, 50 Teilen Eisessig und 100 Teilen Aceton voraus. Das Fixiermittel wurde dann durch Spülung mit je 10 ml Wasser und durch eine 30 Minuten dauernde Elution mit Wasser entfernt. Im Anschluß erfolgte die Fermentbehandlung. Die Kulturen wurden 30 Minuten mit DNase behandelt. Verwendet wurde eine Lösung von 200 µg/ml DNase (NBCo) in Phosphat gepufferter Salzlösung. Im Anschluß daran wurde die so gelöste DNS-Fraktion mit kalter TCA in der Art wie oben beschrieben ausgewaschen. Es verblieb in den Zellen also nur markiertes Adenin, welches in die RNS eingebaut worden war.

Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abbildung 3 dargestellt. Auch unter diesen Bedingungen erfolgte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Inkorporation der markierten Vorstufen im Bereich zwischen $3 \times 10^{-2}M$ und $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil. Bei der Anwendung von $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil ist die Inkorporation des radioaktiv markierten Adenins zu 95 % gehemmt. Dieses Experiment hat somit das gleiche Ergebnis erbracht wie die gleichartigen Versuche mit Uracil-2-C14 und Uridin-2-C14.

3) Die Auswirkung von AzaUridin auf die RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen

In einer weiteren Gruppe von Experimenten wurde AzaUridin als möglicher Inhibitor der RNS-Synthese auf nicht-infizierte Zellen untersucht. Die Experimente wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie dies oben für den Inhibitor AzaUracil beschrieben worden ist. Für die Versuche wurden FL-Zellen oder HeLa-Zellen verwendet. Als Maß für die RNS-Synthese diente in beiden Experimenten die Inkorporation von Uracil-2-C14 in die säureunlösliche Fraktion der Zellen.

Das Ergebnis dieser Experimente ist in der Tabelle 1 dargestellt. Es zeigt sich, daß AzaUracil nicht zu einer Hemmung führt. In den beiden hier durchgeführten Versuchen findet sich eine gewisse Steigerung der Inkorporation der radioaktiv markierten Vorstufe. Eine Erklärung für diesen Befund kann auf Grund der hier durchgeführten Experimente nicht gegeben werden.

B Hemmung der RNS-Synthese durch AzaUracil bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden ebenfalls an nicht-infizierten Gewebekulturzellen durchgeführt. Das

TABELLE 1

Auswirkung von AzaUridin auf die Synthese von Ribonukleinsäure in Kulturen von FL- und HeLa-Zellen

AzaUridin	FL-Zellen	HeLa-Zellen
	Imp/min.	Imp/min.
Kontrolle	1 385	2 790
1 x 10 ⁻² M	1 794	1 665
2 x 10 ⁻² M	2 266	1 500
3 x 10 ⁻² M	2 100	615
4 x 10 ⁻² M	1 898	838
5 x 10 ⁻² M	2 466	902
6 x 10 ⁻² M	2 335	1 022
7 x 10 ⁻² M	2 077	699
8 x 10 ⁻² M	1 839	449

Inkorporation von Uracil-2-C14 in Abhängigkeit von der AzaUridinkonzentration.

Maß für die Inhibitorwirkung war die Inkorporation von Uracil-2-C14 oder Uridin-2-C14. Außer der Wirkung des Proteininhibitors Puromycin wurde der Einfluß eines aminosäurefreien Nährmediums auf die RNS-Synthese durch Einwirkung von AzaUracil untersucht.

1) Die Auswirkung von Puromycin auf die RNS-Synthese

In diesem Experiment wurde die Inkorporation von Uracil-2-C14 unter dem Einfluß steigender Konzentrationen von Puromycin gemessen. Verwendet wurden KB-Zellen. Der Versuch wurde nach der Deckglasmethode durchgeführt; das Ergebnis zeigt die Tabelle 2. Bis zu Puromycinkonzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ erfolgte keine Hemmung der Inkorporation des Uracil-2-C14.

2) Die Auswirkung einer Kombination von AzaUracil und aminosäurefreiem Nährmedium auf die RNS-Synthese

Der Vergleich der Abb. 6 und 7 zeigt, daß die Verwendung von aminosäurefreiem Nährmedium nicht zu einer Zunahme der durch AzaUracil bedingten Hemmung der RNS-Synthese führt.

C Der Einfluß von Inhibitoren der RNS-Synthese und der Proteinsynthese auf die frühe Phase der Virusreproduktion

In der folgenden Gruppe von Experimenten sollte der Einfluß von a) Inhibitoren der RNS-Synthese, b) von Inhibitoren der Proteinsynthese sowie c) einer Kombination beider Inhibitoren auf die Frühphase der Virusreproduktion untersucht werden. Die Hemmung der RNS-Synthese erfolgte in diesen Experimenten mit AzaUracil in Konzentrationen von $6 \times 10^{-2}\text{M}$ oder $9 \times 10^{-2}\text{M}$. Die im ersten Abschnitt beschriebenen Vorversuche hatten ergeben, daß mit diesen Substanzkonzentrationen eine fast voll-

TABELLE 2

Auswirkung von Puromycin auf die Synthese von Ribonukleinsäure in Kulturen von KB-Zellen

Puromycin $\mu\text{g/ml}$	KB-Zellen
	Imp/min.
Kontrolle	2 122
50	1 676
100	1 829
125	1 715
250	2 149
500	1 821
1 000	1 206

Inkorporation von Uracil-2-C¹⁴ in Abhängigkeit von der Puromycinkonzentration.

ständige Hemmung der RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen erzielt werden kann. Zur Hemmung der Proteinsynthese ist Puromycin in verschiedenen Konzentrationen verwandt worden. Bei einem Versuch (Abb. 9) verblieben die Gewebekulturen während der Einwirkung der Inhibitoren und der Virusadsorptionszeit in aminosäure-freiem Nährmedium, wodurch eine zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese erzielt wurde.

Bei Experimenten dieser Gruppe fanden Gewebekulturen von Hühnerfibroblasten in Petrischalen Verwendung. Infiziert wurden die Zellen mit Vesicularstomatitis-Virus.

Zunächst erfuhren die Zellen eine einstündige Vorbehandlung mit den bei den einzelnen Experimenten angegebenen Inhibitoren. Dadurch sollte erreicht werden, daß zum Zeitpunkt der Virusinokulation die von dem Inhibitor veranlaßte Stoffwechselhemmung bereits im vollen Maß ausgeprägt ist. Dem Inhibitor war Zeit gegeben, bis in das Innere der Zellen eindringen zu können. Die halbstündige Virusinokulation und die zweieinhalbstündige Virusadsorptionszeit erfolgten unter der Einwirkung von Inhibitoren bzw. deren Kombination.

Da durch die Zugabe von Inokulationsvirus eine Verdünnung der Inhibitorlösung zustandekommen würde, mußten zunächst konzentriertere Stammlösungen hergestellt werden. Es erfolgte dann die Verdünnung des Inhibitors mit Stamm-Virus (VSV) im Verhältnis 1:5. Für die Vorbehandlung wurde eine analoge Verdünnung der Inhibitorlösung die Zugabe normalen Eagle-Mediums im Verhältnis 1:5 erreicht. Auf diese Weise wurde die in den einzelnen Experimenten angegebenen Endkonzentrationen hergestellt.

Drei Stunden nach Inokulationsbeginn wurden die Kulturen dreimal mit inhibitorfreiem, 5 % KS enthaltenden, Eagle-Medium gewaschen, um den Inhibitor zu entfernen. Dies ist der als "Reversion" angegebene Zeitpunkt. Zum Zweck der Elution von noch anhaftendem Virus wurden 5 ml inhibitorfreies Nährmedium aufgegeben und nach einer weiteren halbstündigen Inkubation eine zweite Waschung mit je 2 x 3 ml inhibitorfreiem Nährmedium vorgenommen und Erhaltungsmedium ohne Inhibitoren aufgegeben. Zu den aus den einzelnen Versuchen ersichtlichen Zeitpunkten wurde aus je einer Petrischale das überstehende Nährmedium zur Titerbestimmung abgefüllt.

In einem ersten Experiment kam Puromycin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml und AzaUracil in einer Konzentration von

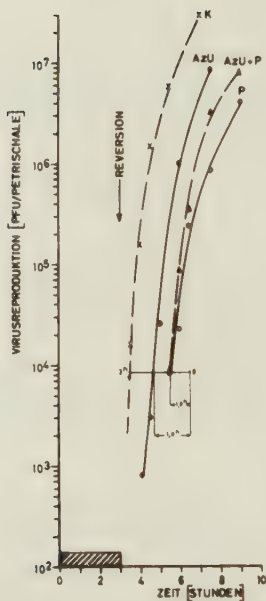


Abb. 9 Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. Jeweils eine Versuchsreihe wurde mit dem Inhibitor AzaUracil (AzU ●—●), Puromycin (P o—o) und einer Kombination beider Inhibitoren (AzU + P ▲---▲) 1 Stunde vorbehandelt. Eine Kontrollreihe (K x---x) verblieb ohne Inhibitor. Danach Infektion der Kulturen und 3 stündige Inkubation unter der Einwirkung der Inhibitoren. Reversion der Hemmwirkung durch Waschen der Kulturreihen. Aufbringen von neuem Nährmedium. Messung der nachfolgenden Virusreproduktion. Die Gewebekulturen wurden in aminosäurefreiem Nährmedium angezüchtet, das auch bei der Durchführung des Experimentes verwendet wurde. - Nach Reversion von $9 \times 10^{-2} \text{ M}$ AzaUracil (AzU) Verzögerung um 1,2 Stunden, eingesparte Zeit somit 1,8 Stunden (resistente Periode) 50 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (P) oder die Kombination beider Hemmsubstanzen (AzU + P) bedingen eine resistente Periode von 1 Stunde.

$9 \times 10^{-2} M$ zur Anwendung. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Abbildung 10 dargestellt. Die vier Kurven entsprechen 1) einer nicht mit Inhibitoren behandelten Kontrollreihe (K), 2) einer Versuchsreihe, die lediglich mit Puromycin (P), 3) einer Versuchsreihe, die ausschließlich mit AzaUracil (AzU), 4) einer Versuchsreihe, die mit einer Kombination von Puromycin und AzaUracil behandelt wurde. (AzU + P). Jeweils zur 3. Stunde nach Infektionsbeginn, wurden die Inhibitoren durch Waschen entfernt. Nach Aufhebung der Inhibition wurde frisches, serumhaltiges Eagle-Medium auf die Zellen gegeben und die nachfolgende Reproduktion gemessen. Die Kurven sind die graphischen Darstellungen der Kinetik der Virusreproduktion. Würden sämtliche Vorgänge der Virusreproduktion durch die angewendeten Inhibitoren gehemmt werden, dann müßten die drei Versuchskurven P, AzU und AzU + P um drei Stunden später ansteigen als die Kontrollkurve. Es zeigt sich jedoch, daß die Virusreproduktion der drei Versuchsreihen frühzeitiger beginnt. Die Kurve der lediglich mit AzaUracil behandelten Versuchsreihe (AzU) steigt nur eine Stunde später an als die der Kontrollreihe; es sind somit zwei Stunden "eingespart" worden.

Die nur mit Puromycin (P) oder mit der Kombination beider Inhibitoren (AzU + P) behandelten beiden Versuchsreihen zeigen einen gegenüber der Kontrolle nur um 2,4 Stunden verspäteten Anstieg der Virusreproduktion; hier sind somit 0,6 Stunden "eingespart" worden. Es müssen somit auch unter der Einwirkung der Inhibitoren Vorgänge der Virusreproduktion abgelaufen sein. Nach Aufhebung der Inhibitorwirkung konnte von diesem Stadium an die Virusreproduktion weiter anlaufen. Die dabei eingesparte Zeit ist die gegen den Inhibitor resistente Periode der Virusreproduktion.

Die Zeitdifferenz beträgt bei dem in der Abbildung 10 dargestellten Experiment für die mit AzaUracil behandelte Versuchsreihe (AzU) 2,0 Stunden. Dagegen ist die resistente Periode der nur mit Puromycin oder der mit beiden Inhibitoren

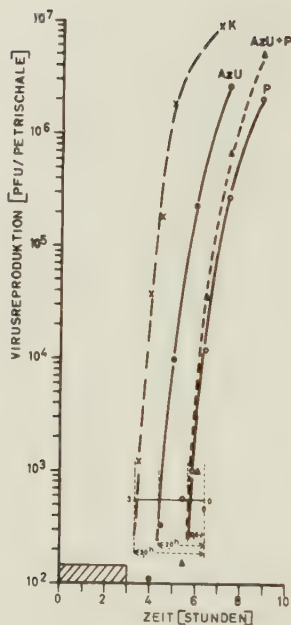


Abb. 10 Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. Anzüchtung der Kulturen und Durchführung des Experimentes mit Eagle-Nährmedium. - Bei Anwendung von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ Aza-Uracil (AzU $\bullet$ — $\bullet$) findet sich eine resistente Periode von 2,0 Stunden, bei $25 \mu\text{g/ml}$ Puromycin (P $\circ$ — $\circ$) und der Kombination beider Hemmsubstanzen AzU + P $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) eine solche von 0,6 Stunden. Kontrollreihe: (K x—x).

gleichzeitig behandelten Versuchsreihe mit 0,6 Stunden deutlich kürzer. Während der dreistündigen Inhibitorwirkung vermag also Puromycin und seine Kombination mit AzaUracil die Virusreproduktion während eines längeren Zeitraumes zu hemmen, als AzaUracil allein.

In der in Abbildung 11 dargestellten Versuchsreihe wurde Puromycin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$, AzaUracil in einer Konzentration von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ bis zur dritten Stunde nach Infektionsbeginn angewandt. Es ergibt sich in diesem Experiment bei Anwendung von AzaUracil allein (AzU) eine resistente Periode von 2,2 Stunden, bei Puromycin allein (P) eine solche von 0,8 Stunden. Die mit der Kombination der beiden Inhibitoren behandelte Versuchsreihe (AzU + P) zeigt ebenfalls eine resistente Periode von 0,8 Stunden. Wie bereits bei dem Versuch, der in Abbildung 10 dargestellt ist, verläuft der Anstieg dieser Reproduktionskurve etwas steiler als derjenige, der lediglich mit Puromycin behandelten Kulturen.

Bei dem in Abbildung 12 dargestellten Experiment kam AzaUracil in einer Konzentration von nur $6 \times 10^{-2} \text{M}$ zur Anwendung. Die Puromycinkonzentration betrug $50 \mu\text{g/ml}$. Es ergibt sich eine resistente Periode von 2,2 Stunden, wenn die Kulturen bis zur dritten Stunde nach Infektionsbeginn lediglich mit AzaUracil (AzU) behandelt wurden. Die in diesem Experiment angewendete Puromycinkonzentration (P) führt zu einer resistenten Periode von 0,4 Stunden Dauer. Eine Kombination beider Inhibitoren wurde in diesem Experiment nicht durchgeführt.

Bei einem weiteren Experiment wurden die Kulturen während der Dauer der Einwirkung der Inhibitoren in einem aminosäurefreien Nährmedium gehalten. Mit dieser Versuchsanordnung sollte eine zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese erreicht werden. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, stellt sich bei der Anwendung von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ AzaUracil (AzU) eine resistente Periode von 1,8 Stunden ein. Sowohl die Anwendung von $50 \mu\text{g/ml}$ Puromycin allein

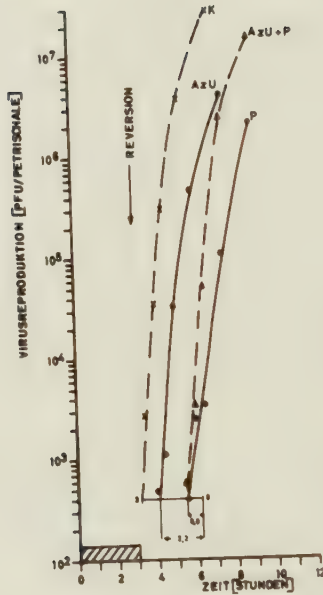


Abb. 11 Reproduktion von Vesikularstomatitis-Virus in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. - Bei Anwendung von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ AzaUracil (AzU ●—●) findet sich eine resistente Periode von 2,2 Stunden, bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (P ○—○) und der Kombination beider Hemmsubstanzen (AzU + P ▲---▲) eine solche von 0,8 Stunden. Kontrollreihe: (K x----x).

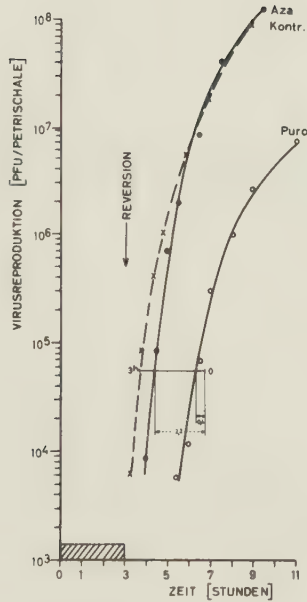


Abb. 12 Reproduktion von Vesicularstomatitis-Virus in Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten. - Bei Anwendung von 6×10^{-2} M AzaUracil (AzU ●—●) findet sich eine resistente Periode von 2,2 Stunden, bei 50 μ g/ml Puromycin (P o—o) eine solche von 0,4 Stunden. Kontrollreihe: (K x---x).

(P) als auch die Kombination mit AzaUracil (AzU + P) führt zu resistenten Perioden von jeweils 1,0 Stunde. Auch hier kommt es im Anschluß an die kombinierte Behandlung (Puromycin + AzaUracil) zu einem etwas steileren Verlauf der Reproduktionskurve. Ein wesentlicher Unterschied zu den erst genannten drei Experimenten dieser Gruppe konnte somit nicht beobachtet werden.

D Einfluß der Inhibitoren der DNS- und Proteinsynthese auf die Proteinsynthese nicht-infizierter Zellen

Weiter sollte geklärt werden, ob der Zusatz von AzaUracil zu einer bestimmten Puromycinkonzentration eine zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese verursacht.

In diesem Experiment wurden Hühnerfibroblasten in Petrischalen auf Deckgläsern verwendet. Das Inkorporationsexperiment wurde nach der Deckglasmethode durchgeführt. Drei Versuchsreihen waren für die Fragestellung erforderlich. Eine erste Reihe erhielt AzaUracil in einer Konzentration von $5 \times 10^{-2} M$, eine zweite AzaUracil in einer Konzentration von $9 \times 10^{-2} M$, beide Reihen jeweils in Verbindung mit 20, 40 bzw. 60 $\mu g/ml$ Puromycin. Eine dritte Versuchsreihe diente als Kontrolle und erhielt kein AzaUracil, sondern lediglich 20, 40 bzw. 60 $\mu g/ml$ Puromycin. Eine Kontrollschale in jeder Versuchsreihe blieb ohne Proteinhemmer. Zur Herstellung der Inhibitorlösung wurde für das gesamte Experiment ein Valin-freies Eagle-Medium verwendet ohne Zusatz von Serum, da als Maß für die Proteinsynthese die Inkorporation von radioaktiv markiertem Valin-1-C14 angewendet wurde. Um die im Experiment angegebenen Endkonzentrationen der beiden Inhibitoren zu erreichen, wurden konzentrierte Stammlösungen hergestellt, die durch entsprechende Mischung zu den angegebenen Endkonzentrationen verdünnt wurden. Nach einer einstündigen Vorbehandlung der Kulturen wurden pro Petrischale 1 μCi Valin-1-C14 zugesetzt. Nach einer Einwirkungsdauer von einer Stunde wurden die Kulturen für den Zeitraum einer halben Stunde in eiskalter 5 % TCA eingelegt, gründlich mit kalter TCA gewaschen, in die Zählchalchen eingelegt und getrocknet.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Abbildung 13 dargestellt. Es zeigt sich zunächst in der nur mit Puromycin behandelten Versuchsreihe eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proteinsynthese von 88 % der Kontrollen bei 20 $\mu\text{g/ml}$, von 95 % bei 60 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin. Bei der mit $6 \times 10^{-2}\text{M}$ Aza-Uracil behandelten Versuchsreihe zeigt sich zunächst, daß auch ohne Puromycin eine deutliche Hemmung der Proteinsynthese eintritt und zwar um 45 % der maximalen Inkorporation. Bei Puromycinkonzentrationen von 20, 40, 60 $\mu\text{g/ml}$ im Zusammenhang mit $6 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil ist die Hemmung der Valininkorporation stärker, als in der allein mit Puromycin behandelten Versuchsreihe. Die Hemmung der Proteinsynthese beträgt hier 91 % bei 20 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin und $6 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil und 96 % bei gleicher AzaUracil-Konzentration und 60 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin. Die dritte Versuchsreihe wurde mit $9 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil behandelt. Die allein durch diese Inhibitorkonzentration verursachte Hemmung der Proteinsynthese beträgt 62 %. Es findet sich eine noch stärkere Hemmung der Proteinsynthese bei der kombinierten Anwendung von AzaUracil in dieser Konzentration und Puromycin. Die Proteinsynthese wird bei $9 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil und 20 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zu 93 %, bei gleicher AzaUracil-Konzentration und 60 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zu 98 % gehemmt. Aus der Abbildung 13 ist ersichtlich, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch die kombinierte Anwendung von $9 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil und 20 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin gegenüber der alleinigen Anwendung von 20 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin von 88 % auf 93 % gesteigert ist.

Es ergibt sich somit, daß die kombinierte Anwendung von AzaUracil und Puromycin zu einer zusätzlichen Hemmung der Proteinsynthese führt. Im Gegensatz dazu, konnte bei der Untersuchung der Reproduktionskinetik von Vesikularstomatitis-Virus unter der kombinierten Anwendung der beiden Inhibitoren keine Verkürzung der resistenten Periode beobachtet werden. Ein mit dieser Methode feststellbarer Einfluß der Kombination beider Inhibitoren auf die Vorgänge der Virusreproduktion besteht somit nicht.

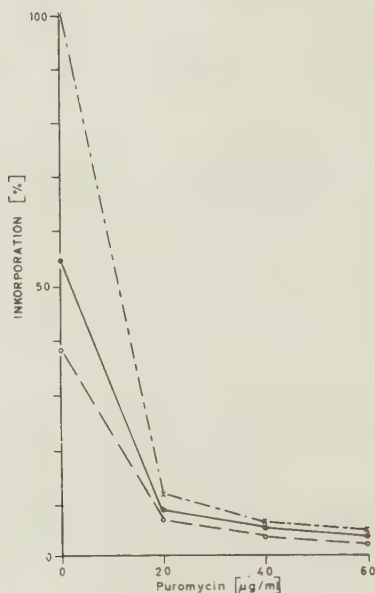


Abb. 13 Hemmung der Proteinsynthese durch AzaUracil, Puromycin und der Kombination beider Inhibitoren in nicht-infizierten Kulturen von HF-Zellen. Gemessen wurde die Inkorporation von Valin-1-C14. - Es findet sich eine Hemmung der Proteinsynthese bereits durch AzaUracil allein (um 45 % durch $6 \times 10^{-2}\text{M}$ (●), um 62 % durch $9 \times 10^{-2}\text{M}$ (o)). Zunahme der Hemmung bei der Kombination beider Inhibitoren ($6 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil + Puromycin ●—●, $9 \times 10^{-2}\text{M}$ AzaUracil + Puromycin o---o, Kontrollreihe Puromycin x---x).

DISKUSSION

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob der Ablauf der Virusreproduktion durch die Anwendung eines Inhibitors der RNS-Synthese bereits während der ersten Stunden nach Infektionsbeginn beeinflusst werden kann. Dieser erste Zeitabschnitt ist gegenüber Inhibitoren der Proteinsynthese weniger empfindlich, als die nachfolgenden Vorgänge des Virusreproduktionszyklus. Es besteht die Möglichkeit, daß das fehlende Ansprechen auf Proteininhibitoren darauf beruht, daß während dieser Zeitspanne neben einer Synthese von Proteinen noch andere Stoffwechselprozesse ablaufen. Es wurde deshalb untersucht, ob die Dauer der gegen Inhibitoren der Proteinsynthese resistenten Periode der Virusreproduktion durch zusätzliche Anwendung von AzaUracil beeinflusst werden kann.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die gegen einen Proteininhibitor resistente Frühphase der Virusreproduktion durch die gleichzeitige Anwendung beider Inhibitoren nicht verkürzt werden kann; obwohl ein entsprechender Einfluß auf die Protein- und RNS-Synthese nicht infizierter Zellen nachweisbar ist.

A Inhibitoren

1) Wirkungsmechanismus von Puromycin

Eine Hemmung der Proteinsynthese mit Proteininhibitoren ist sowohl in nicht-infizierten Säugetierzellen (YARMOLINSKY et al. (1959); RABINOWITZ et al. (1962); WETTSTEIN et al. (1964)) bei Experimenten mit Bakterien (WISSEMANN Jr. et al. (1953); GALE et al. (1953); CREASER (1955); TAKEDA et al. (1960)) und in Virus-infizierten Systemen (WECKER (1963); WHEELLOCK (1962)) beobachtet worden.

Das Antibiotikum Puromycin wird aus *Streptomyces alboniger* gewonnen. Seine Struktur wurde von WALLER et al. (1959) und BAKER et al. (1954) als 6-dimethylamino-9-(3'-p-methoxy-L-phenylalanyl-amino-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-purin aufgeklärt und die Substanz synthetisiert.

Ort der Proteinsynthese in der Zelle ist das Ribosom. Hier werden die Aminosäuren zu Polypeptidketten verbunden (ALLEN et al. (1962 a)). Puromycin greift hemmend direkt am Ribosom an (NATHANS et al. (1961)).

Auf Grund von Untersuchungen mit Kaninchenretikulocyten äußerten MORRIS et al. (1961) die Vermutung, daß die Hämoglobinketten unter Puromycineinfluß direkt von den Ribosomen abgesetzt würden. Zu dem gleichen Ergebnis kamen RABINOVITZ et al. (1962) bei in vitro-Experimenten mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Kaninchenretikulocyten. ALLEN et al. (1962 b) beobachteten die Freisetzung markierter Polypeptide ebenfalls bei Versuchen mit Ribosomen von Kaninchenretikulocyten unter Puromycinwirkung.

Diese durch Puromycin hervorgerufene Loslösung der Polypeptide von den Ribosomen erfordert keinen ATP-abhängigen Prozess, ist also von dem Zellenenergieaufwand unabhängig (ALLEN et al. (1962 b)).

Bei dem Vergleich der Strukturformel von Puromycin mit den Aminosäure-bindenden Molekülgruppen der t-RNS, ist eine deutliche Ähnlichkeit der Strukturformel feststellbar (YARMOLINSKY et al. (1959)). Die Peptidketten, die an die t-RNS gebunden werden, scheinen sich statt dessen mit der freien Aminogruppe des Puromycins verbinden zu können (ALLEN et al. (1962 b); NATHANS (1964)).

Nach dem gleichen Prinzip können auch einzelne Aminosäuren von Puromycin gebunden werden. So haben YARMOLINSKY et al. (1959) gezeigt, daß die Überführung von markiertem Leucin aus dem Leucin-t-RNS-Komplex in Protein durch Puromycin gehemmt wird. Später haben auch NATHANS et al. (1962) an *E. coli* nachweisen können, daß die Überführung der Aminosäuren von t-RNS in Protein der Puromycininhibition unterliegt.

Eine von dem bisher skizzierten Wirkungsmechanismus des Puromycins abweichende Darstellung geben WILLIAMSON et al. (1964). Demnach bewegen sich die Ribosomen entlang der m-RNS bei der Bildung der Polypeptidkette. Hat das Ribosom das Ende der m-RNS erreicht, wird die Polypeptidkette von dem Ribosom entfernt. In Gegenwart von Puromycin werden die Polypeptidketten zwar in gleicher Weise synthetisiert, jedoch wird der Wirkungsmechanismus darin gesehen, daß die Polypeptidketten zerbrechen. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, daß im Gegensatz zu den nicht durch Puromycin beeinflussten Ribosomen unter Puromycin eine erhöhte Anzahl kleiner Peptidketten synthetisiert wird.

Zu anderen Schlußfolgerungen kamen CLARK et al. (1965). Demnach hemmt Puromycin nicht die Bindung des aktivierten Aminosäure-t-RNS-Komplexes an den Ribosomen, sondern wirkt als Analogon des Aminosäure-t-RNS-Komplexes während der Peptidsynthese. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung von Peptiden.

Nach der Entfernung der Hemmsubstanz aus den behandelten Systemen erholen diese sich wieder und zeigen keinen weiteren durch Puromycin hervorgerufenen Effekt (NATHANS et al. (1961); WHEELOCK (1962); WECKER (1963)). Die Hemmwirkung ist also vollständig reversibel. Puromycin als Inhibitor erwies sich in den verschiedensten, z.T. schon er-

währnten Systemen wirksam. z.B. bei der Inkorporation einer markierten Aminosäure in zellfreie Präparationen von Rattenleber (YARMOLINSKY et al. (1959)), bei der Bildung des Enzyms- β -Galaktosidase in *Staphylococcus aureus* (CREASER (1955)) und bei der Proteinsynthese von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (RABINOVITZ et al. (1962)).

Auch in den Reproduktionszyklus von Viren greift Puromycin ein: z.B. bei Equine-Encephalomyelitis-Virus (SREEVALSAN et al. (1964)), Newcastle-Disease-Virus (WHEELLOCK (1962)), Sendai-Virus (WHITE et al. (1965 a)), Western-Equine-Encephalitis-Virus (WECKER (1963)), Mengovirus (BALTIMORE et al. (1963 a)) und Poliomyelitis virus (LEVINTOW et al. (1962); WECKER (1963)). Die Substanz hemmt die Bildung einiger Fröhenzyme, die Bildung der Virus-Nukleinsäure und die Bildung der Hüllenproteine.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit Puromycin in einer Konzentration von $60 \mu\text{g/ml}$ die Inkorporation von radioaktiv markiertem Valin in Hühnerfibroblasten zu 95 % gehemmt werden. (Abb. 13.) Dieses Resultat entspricht in etwa den Ergebnissen von SREEVALSAN et al. (1964), die mit einer Puromycinkonzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ eine 99 %ige Inkorporationshemmung von markiertem Histidin in Hühnerfibroblasten fanden. Mit $100 \mu\text{g/ml}$ verwendeten FRANKLIN et al. (1962) wesentlich höhere Puromycinkonzentrationen, um die Inkorporation von markiertem Leucin in L-Zellen völlig zu unterbinden. WHITE et al. (1965 a) benötigten noch höhere Puromycinkonzentrationen ($300 \mu\text{g/ml}$), um die Reproduktion von Sendai-Virus vollständig hemmen zu können.

2) Wirkungsmechanismus von AzaUracil

In Versuchen mit Bakterien erwiesen sich Uracil (MARKHAM (1958)) und Uridin (HANDSCHUMACHER et al. (1956)) als

kompetitive Antagonisten des AzaUracils. Auch bei AzaUridin ist der Inhibitionseffekt durch die Zugabe von Uridin oder Cytosin im Überschuß reversibel, Thymidin dagegen hat keine Wirkung (RADA et al. (1966)).

Im intermediären Stoffwechsel wird das Ribosid der Orotsäure, Orotidin-5-phosphat, durch Decarboxylierung am Pyrimidingerüst in Uridin-5-phosphat umgewandelt. Dies ist der Punkt, an dem AzaUracil (LODISH et al. (1964)) bzw. AzaUridin (HANDSCHUMACHER et al. (1958)), bzw. AzaUridin-5-phosphat (PASTERNAK et al. (1959)) als kompetitive Hemmer der Orotsäuredecarboxylase einwirken. Durch Blockierung der Umwandlung von Orotsäure in Uridin hemmt AzaUracil (LODISH et al. (1964)) die RNS-Synthese.

Folgende Befunde trugen zur Klärung des Wirkungsmechanismus des AzaUracils bzw. AzaUridins bei. Werden Kulturen von *E. coli* mit AzaUracil behandelt, häuft sich im umgebenden Medium Orotsäure an, eine Vorstufe des Uracils in der Nukleinsäuresynthese (SKODA et al. (1956)). SKODA et al. (1956) zeigen, daß Orotsäure und deren Ribosid, Orotidin-5-phosphat, Antagonisten des AzaUracils sind. Patienten, die mit AzaUracil behandelt werden, scheiden im Urin Orotsäure und Orotidin vermehrt aus. (FALLON et al. (1961)).

Die Wirkung des AzaUracils beruht nicht auf einer einfachen Verdrängung des Uracils aus der Nukleinsäuresynthese. In diesem Falle wäre zu erwarten, daß in einigen Stoffwechselmetaboliten der RNS-Synthese AzaUracil in grösserer Menge eingebaut würde. HANDSCHUMACHER (1957 a) konnte aber mit Versuchen an *Streptococcus faecalis* zeigen, daß in die RNS nur 1 % bis 5 % AzaUracil eingebaut werden und daß fast kein Einbau in die DNS zu beobachten ist. Bei einem, in dieser Arbeit durchgeführten Versuch, wurde vergleichsweise die Inkorporation der Purinbase Adenin unter AzaUracilwirkung in FL-Zellen gemessen.

Auch hier war bei einer Konzentration von $9 \times 10^{-2} M$ Aza-Uracil die Inkorporation des radioaktiv markierten Adenins zu 95 % gehemmt (Abb. 3). Es kann jedoch angenommen werden, daß die Purinbase Adenin nicht von der "falschen" Pyrimidinbase AzaUracil von der Nukleinsäuresynthese verdrängt wird. Die durch AzaUracil bewirkte Hemmung der Inkorporation von Adenin ist ebenso groß wie die Hemmung der Uridin-Inkorporation. Auch diese Versuche weisen darauf hin, daß die Wirkung des AzaUracils nicht auf einer konzentrations-abhängigen Verdrängung des Uracils beruht.

Die von den oben angeführten Autoren beschriebene Aufhebung des AzaUracileffektes durch Zugabe von Uracil und Uridin dürfte darauf beruhen, daß das zur Nukleinsäuresynthese befähigte System (Bakterien (SORM et al. (1956 a); SKODA et al. (1956), (1958); HANDSCHUMACHER et al. (1956); MARKHAM (1958) und Virus-infizierte Zellen (RADA et al. (1966)) auf das im Überschuß exogen zugeführte Uracil bzw. Uridin zurückgreift und so den Angriffspunkt des AzaUracils umgeht.

Eine AzaUracilwirkung konnte an den verschiedensten Systemen nachgewiesen werden. So wurde die Inkorporation von Uracil an Rattenleberschitten gehemmt (MELNIK et al. (1958)). Bei Experimenten mit bösartigen Geschwülsten in Versuchstieren wurde das Wachstum der Tumoren verhindert (HAKALA et al (1956); SORM et al. (1956 b); HANDSCHUMACHER et al. (1958)). Auch das Wachstum von Bakterien (SKODA et al. (1956); MARKHAM (1958); TAKAGI et al. (1958); OTSUJI et al. (1959)) und Viren (PARDEE et al. (1960)) konnte durch Aza-Uracil gehemmt werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen über die Wirkung des AzaUracils auf die Reproduktion des Vesikularstomatitis-Virus wurde eine 99 % Inhibition durch

Konzentrationen von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ erreicht (Abb. 1). Aber nicht nur die Virusreproduktion, sondern auch die RNS-Synthese in nicht-infizierten Zellsystemen wurde gehemmt. Gemessen am Einbau markierter Purin- oder Pyrimidinbasen konnte die RNS-Synthese in verschiedenen Zellstämmen durch Konzentrationen von $9 \times 10^{-2} \text{M}$ AzaUracil zu etwa 99 % gehemmt werden (Abb. 2, 4, 5, 6, 7, 8). Diese Konzentrationen entsprechen somit denen, die zur Hemmung der Virusreproduktionen erforderlich sind.

Auch AzaUridin hatte bei Mäusen (BRUEMMER et al. (1962)) und Menschen (FALLON et al. (1961)) einen cytostatischen, bei Viren (ROBY et al. (1965); RADA et al. (1966)) einen wachstumshemmenden Einfluß. Sowohl vom AzaUracil als auch vom AzaUridin werden somit vergleichbare Hemmwirkungen berichtet. Dies spricht für eine enge Beziehung der beiden Substanzen zueinander. HANDSCHUMACHER (1957 a u. b) wies darauf hin, daß für die Wirksamkeit von AzaUracil die vorherige Umwandlung in ribosehaltige Derivate notwendig ist. Damit übereinstimmend zeigten SKODA et al. (1957, 1958), daß AzaUracil von E. coli zu AzaUridin umgewandelt wird, bei Trypanosoma equiperdum konnten RUBIN et al. (1962) eine solche Umwandlung nachweisen. BRUEMMER et al. (1962) demonstrierte die Umwandlung des AzaUracils über das AzaUridin zur AzaUridylsäure, die dem Uridin-5-phosphat entsprechen würde.

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß sich AzaUracil und AzaUridin in ihrer Wirkung nicht unterscheiden. SCHINDLER et al. (1957) konnten jedoch mit nur geringen Substratkonzentrationen von AzaUridin eine deutliche Hemmung des Zellwachstums von Sarkomen auslösen, während höhere Konzentrationen von AzaUracil keine Wirkung hatten. Als wirksame Konzentrationen von AzaUridin werden angegeben: $2 \times 10^{-3} \text{M}$ (HANDSCHUMACHER et al. (1958); RADA et al. (1961)), $4 \times 10^{-3} \text{M}$ (RADA et al. (1966)) und $4 \times 10^{-5} \text{M}$ (ROBY et al. (1965)).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte jedoch mit AzaUridinkonzentrationen von $1 \times 10^{-2}M$ bis $8 \times 10^{-2}M$ keine Hemmung der Inkorporation markierter Vorstufen beobachtet werden (Tab. 1 u. 2).

B Protein- und RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen

Die Proteinsynthese nicht-infizierter Zellen wird durch die kombinierte Anwendung von Protein- und RNS-Syntheseinhibitoren stärker gehemmt, als durch die alleinige Anwendung eines Proteinsynthesehemmers. Die zusätzliche Hemmung der RNS-Synthese bewirkt somit auch eine zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese. Ein Zusammenhang zwischen der hier durchgeführten RNS-Synthesehemmung und der Proteinsynthesehemmung kann somit angenommen werden. Im Folgenden wird daher der Zusammenhang der RNS-Synthese und der Proteinsynthese in nicht-infizierten Zellen diskutiert.

1) Abhängigkeit der RNS-Synthese von der Proteinsynthese

Die Proteinsynthese steht in unmittelbarer Abhängigkeit von der RNS-Synthese (GALE et al. (1955); PARDEE et al. (1956, 1960); BEN-ISHAI et al. (1956); FARNHAM (1965)). Umgekehrt ist aber die RNS-Synthese nicht unmittelbar von der Proteinsynthese abhängig (de DENKEN-GREUSON (1953); BEN-ISHAI et al. (1956); HAHN et al. (1957); FRANKLIN et al. (1962); NEIDHARDT (1963)), dies bedeutet aber nicht, daß die RNS-Synthese ohne jede Proteinsynthese möglich ist. So erfordert die Bildung eines Protein, nämlich des Enzyms β -Galaktosidase in *E. coli*, die gleichzeitige Synthese von RNS (PARDEE (1954)). Andererseits konnte jedoch nachgewiesen werden, daß in *E. coli* bei Proteinsynthese-

hemmung eine RNS auftritt, welche die schnelle Synthese eines kleinen Anteils des Enzyms β -Galaktosidase zuläßt (STERN et al. (1964)). Bei einer Proteinsynthesehemmung, die nicht sofort letal ist, kann somit noch RNS gebildet werden (NEIDHARDT et al. (1963); ENNIS et al. (1964); STERN et al. (1964)). Hieraus ergibt sich die Frage, ob unter der Einwirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese eine qualitativ veränderte RNS synthetisiert wird. Untersuchungen darüber wurden vor allem an Bakterien unter dem Einfluß von Chloramphenicol durchgeführt.

2) Chloramphenicol-RNS (c-RNS)

Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese (GALE et al. (1953)), eine Nukleinsäuresynthese kann jedoch noch stattfinden (WISSEMAN et al. (1953); PARDEE et al. (1956); HAHN et al. (1957); HABERMANN (1961)). Die unter diesen Bedingungen gebildete RNS wird als "Chloramphenicol-RNS" (c-RNS) bezeichnet.

Die Untersuchungen der c-RNS führten zu zwei gegensätzlichen Befunden. Bei verminderter Proteinsynthese soll eine voll funktionstüchtige RNS synthetisiert werden können (ARONSON et al. (1961); PARDEE et al. (1956); HAHN et al. (1957)).

Zu gegensätzlichen Ergebnissen bei der Untersuchung der c-RNS kam HABERMANN (1961) mit Versuchen an Bakterien. Auf Grund dieser Ergebnisse wirkt die c-RNS, nach Aufhebung der Inhibitorwirkung, ihrerseits als Inhibitor der Proteinsynthese.

HABERMANN (1961) stellte Untersuchungen an, wobei er neben der Proteinsynthesehemmung durch Chloramphenicol die RNS-Synthese durch AzaUracil hemmte. Nach Aufhebung der Inhi-

bition erholen sich die mit beiden Inhibitoren behandelten Zellen schneller als solche Zellen, die allein dem Einfluß von Chloramphenicol ausgesetzt waren. Die Blockierung der c-RNS-Synthese vermittelt AzaUracil verhindert die sekundäre Hemmung der Proteinsynthese durch die c-RNS. Hieraus wird der Schluß gezogen, daß durch die Anwendung von AzaUracil der toxische Einfluß der o-RNS unterbunden wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit ist von besonderem Interesse, daß Puromycin, das ebenso wie Chloramphenicol die Proteinsynthese hemmt, eine RNS-Synthese zuläßt (TAKEDA et al. (1960); ENNIS et al. (1964)).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen erstens, daß bei Proteinsynthesehemmung die RNS-Synthese nicht gehemmt wird und lassen zweitens den Schluß zu, daß die unter Puromycineinwirkung synthetisierte RNS funktions-tüchtig ist.

Bei Inhibition der Proteinsynthese in KB-Zellen durch Puromycin in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ wurde die RNS-Synthese praktisch nicht gehemmt (Tab. 3). $100 \mu\text{g/ml}$ Puromycin unterbrechen aber fast die Proteinsynthese (FRANKLIN et al. (1962)). FRANKLIN et al. (1962) erzielten in L-Zellen durch $100 \mu\text{g/ml}$ Puromycin eine Hemmung der RNS-Synthese von 53 %. Somit ist auch in dem, von diesen Autoren verwendeten Zellsystem bei völliger Hemmung der Proteinsynthese noch eine RNS-Synthese möglich.

Ein in dieser Arbeit durchgeführter Versuch (Abb. 13) läßt die Folgerung zu, daß die unter Puromycinwirkung gebildete RNS funktionstüchtig ist. In diesem Experiment wurde gleichzeitig die RNS- und Proteinsynthese gehemmt. Somit wurde verhindert, daß eine für die Proteinsynthese toxische RNS gebildet werden kann, die zusätzlich die Proteinsynthese hemmt. Bei Vorhandensein einer solchen toxi-

schen RNS müßte eine geringere Hemmung der Proteinsynthese auftreten, wenn die Entstehung dieser RNS durch AzaUracil verhindert wird. Die kombinierte Inhibitoranwendung hemmt jedoch die Proteinsynthese stärker als Puromycin allein. Die bei alleiniger Proteinsynthesehemmung noch mögliche RNS-Synthese bewirkte also keine zusätzliche Proteinsynthesehemmung. Daher kann angenommen werden, daß die unter Puromycinwirkung gebildete RNS funktionstüchtig ist. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Befunden von TAKEDA et al. (1960) und ENNIS et al. (1964).

3) Abhängigkeit der Proteinsynthese von der RNS-Synthese

In dem Vorhergehenden wurde gezeigt, daß die RNS-Synthese nicht unmittelbar von der Proteinsynthese abhängt. Zu der Frage, wie andererseits die Proteinsynthese von der RNS-Synthese beeinflußt wird, soll auf die Befunde von LEVINTHAL et al. (1962), STERN et al. (1964), NATHANS et al. (1962) hingewiesen werden. Diese besagen, daß ein einzelnes m-RNS-Molekül mehrere Male zur Proteinsynthese verwendet werden kann, daß eine kleine Fraktion m-RNS auch ohne Proteinsynthese gebildet wird und daß die t-RNS nach ihrer Funktionsausübung in der Zelle wieder aufgefunden werden kann. ALLEN et al. (1962 a) berichten von einer katalytischen Wirkung der t-RNS, die DENKEN-GREUSON (1953), GROS et al. (1958), STEUT et al. (1961) davon, daß freie Aminosäuren eine katalytische Rolle bei der Nukleinsäuresynthese ausüben. Diese Befunde sprechen dafür, daß das Verhältnis der Nukleinsäure zur Proteinsynthese ein katalytisches und kein stöchiometrisches ist.

Zur Proteinsynthese bedarf es demnach einer gleichzeitigen RNS-Synthese. Für eine bestimmte Menge synthetisierten Eiweißes ist jedoch eine im Ausmaß wesentlich geringere

RNS-Synthese notwendig. Die alleinige Inhibition der RNS-Synthese um 90 % verminderte bei den hier durchgeführten Experimenten die Proteinsynthese nur um 62 %. Es kann somit angenommen werden, daß die verbleibenden 10 % RNS-Synthese ausreichen, um eine im Ausmaß zwar geringere, aber dennoch deutlich registrierbare Proteinsynthese zu ermöglichen (Abb. 13).

3) Untersuchungen in der frühen Phase der Virusreproduktion

Nach der Diskussion der RNS- und Proteinsynthese und deren Zusammenhänge in nicht-infizierten Zellen soll die Virusreproduktion in der infizierten Zelle behandelt werden.

In diesem Rahmen können nur Stoffwechselvorgänge im Zusammenhang mit RNS-haltigen Viren erörtert werden. Das Wort Viren steht im Folgenden nur für solche Viruspartikel, die RNS als Nukleinsäure enthalten.

1) Virusnukleinsäure als Überträgersubstanz der genetischen Information

Wie bereits dargestellt, wird von der RNS der nicht-infizierten Zelle die genetische Information mittels der m-RNS zum Ort der Proteinsynthese übertragen. Kleine RNS-Viren jedoch benötigen zu ihrer Reproduktion nicht den Syntheseweg, der von der DNS zur RNS führt (COOPER et al. (1962); REICH et al. (1962); HAYWOOD et al. (1963); HOF-SCHNEIDER (1963); SPIEGELMANN et al. (1963); WEISSMANN et al. (1965)). Für die Reproduktion dieser Viren ist keine durch die Zelle induzierte m-RNS-Synthese erforderlich (SIMON (1961); DOI et al. (1962); WHITE et al. (1965 b)). Die Virus-RNS selbst fungiert als m-RNS (ALEXANDER et al. (1958 a,b); SANDERS (1960); WARNER et al. (1963)) und stellt eine selbst-reduplizierende Einheit dar.

Diese Erkenntnis wurde u.a. durch folgende Beobachtung ermöglicht:

Die DNS-abhängige RNS-Synthese normaler Zellen wird durch Aktinomycin D zu 99,9 % gehemmt (KWAMATA et al. (1969); FRANKLIN et al. (1962); HURWITZ et al. (1962); SHATKIN et al. (1962); SÄNGER et al. (1963)), die Reproduktion von RNS-haltigen Viren bleibt dagegen unbeeinflusst (REICH et al. (1961), (1962)).

2) Umstellung des Zellstoffwechsels nach Infektion

Die in die Zelle eingedrungene Virusnukleinsäure bedingt eine grundlegende Umstellung der Synthesevorgänge.

Die zelleigene RNS- (BALTIMORE et al. (1962 a); FRANKLIN et al. (1962); FENWICK (1963); ZIMMERMANN et al. (1963)), DNS- und Proteinsynthese (SALZMANN et al. (1959); FRANKLIN et al. (1962)) werden gehemmt. Es wird vermutet, daß im Anschluß an die Virusinfektion Proteine mit enzymatischer Funktion gebildet werden, welche diese Hemmung der zellulären Synthesemechanismen bedingen (FRANKLIN et al. (1962)). So wird z.B. angenommen, daß die Hemmung der zelleigenen RNS-Synthese nach Virusinfektion darauf beruht, daß die DNS-abhängige RNS-Polymerase der Zelle durch ein solches Virus-spezifisches Protein daran gehindert wird, entweder mit der DNS in Verbindung zu treten oder sich von den DNS-Aggregaten zu lösen (HOLLAND (1962)).

Das Virus induziert weiterhin eine RNS-Synthese, die in einer identischen Reduplikation des infizierenden, parentalen RNS-Moleküls besteht (SHATKIN (1962); BALTIMORE et al. (1963 b)). Der Zeitpunkt, zu dem diese Virus-induzierte RNS-Synthese einsetzt, ist noch nicht geklärt. EGGERS et

al. (1962) schließen aus Versuchen, daß Virus-RNS und Virusprotein ungefähr zur gleichen Zeit auftreten und bereits kurze Zeit später die reifen Viruspartikel vorhanden sind. Diese Autoren sind der Auffassung, daß die RNS-Synthese der Bildung reifer Viren nur kurze Zeit vorangeht (EGGERS et al. (1963 a)).

Hingegen vertreten TERSHAK (1964 a); MUNYON (1964) die Auffassung, daß eine Virus-RNS-Synthese bereits in der Eklipse stattfindet.

3) Enzyme der Virus-RNS-Synthese

Welche Enzyme die Virus-RNS-Synthese benötigt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Beim Studium der für die Virusreproduktion benötigten Enzyme stehen sich im Wesentlichen zwei Ansichten gegenüber:

- 1) Der bereits vor der Virusinfektion vorhandene zelluläre Enzymsatz allein genügt, um die Reproduktion von Viren zu ermöglichen.
- 2) Als Folge der Virusinfektion treten in der Zelle neue Enzyme auf.

WECKER et al. (1961) kamen bei Untersuchungen an embryonalen Hühnerfibroblasten nach Infektion mit dem WEE-Virus zu dem Schluß, daß keine neuen Enzyme für die Synthese von Virus-RNS notwendig seien. Der normale, in der Zelle vorhandene Enzymsatz reiche aus, den für die Zelle neuen Typ der Virus-RNS zu bilden.

Dagegen isolierten HARUNA et al. (1963) aus *E. coli* nach Infektion mit dem RNS-Phagen MS ϕ 2 eine RNS-Polymerase (RNS-Replikase), die RNS-abhängig war. Das Enzym erforderte

das Vorhandensein aller vier Ribosidtriphosphate, sowie eine RNS-Matritze, die ebenfalls alle vier Basen enthält. Zur Funktion des Enzyms wurde eine zum Enzym homologe RNS benötigt. Es erwies sich aber, daß das Enzym nicht immer art-spezifisch war, da es auch mit der RNS von TMV und TYMV-Viren reagierte.

Eine RNS-abhängige RNS-Polymerase wurde in mit Phagen infizierten Bakterien (HARUNA et al. (1963); AUGUST et al. (1963)) in Virus-infizierten Säugetierzellen (BALTIMORE et al. (1962 b), (1963 b); BALTIMORE (1964)) und in Virus-infizierten Pflanzen (SHIPP et al. (1964)) gefunden.

Eine RNS-Synthetase, die nicht mit der RNS-Polymerase identisch sein soll, wurde in Kulturen von E. coli entdeckt, die mit dem Phagen MS 2 infiziert worden waren. Das Enzym konnte in nicht-infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden (WEISSMANN et al. (1963 a,b,c,d,)), (1964 a,b); Die gereinigte Form des Enzyms liegt als Holoenzym in Verbindung mit einer Doppelstrangform der Virus-RNS, der "replicative form", vor (WEISSMANN et al. (1964 b)).

4) Die "replicative form"

Die "replicative form" ist ein spezielles System der Virus-infizierten Zelle, welches der Reduplikation der Virus-RNS dient und in der nicht-infizierten Zelle nicht gefunden wird (MONTAGNIER et al. (1963); AMMAN et al. (1964); KAERNER et al. (1964)). Dieses System unterscheidet sich von der RNS der Einstrang-RNS-Viren dadurch, daß es sich resistent gegenüber RNase verhält, wohingegen die RNS der Einstrang-RNS-Viren durch RNase angegriffen wird (WEISSMANN et al. (1963 d); AMMANN et al. (1964); BALTIMORE et al. (1964); KAERNER et al. (1964); BISHOP et al. (1965)). Dies beruht darauf, daß die "replicative form" aus einem Doppel-RNS-Strang besteht. Dieser wird in der Zelle nach Infektion mit einem Einstrang-RNS-Virus synthetisiert (MONTAGNIER et al. (1963); WEISSMANN et

al. (1963 d); AMMANN et al. (1964); BALTIMORE et al. (1964); KELLY et al. (1964); SHIFF et al. (1964); BURDON et al. (1964); ERIKSON et al. (1964); WEISSMANN et al. (1965); RALPH et al. (1965)).

Die "replicative form" wird nicht kontinuierlich während des gesamten Verlaufes des Virusreproduktionszyklus gebildet. Bei Infektion von E. coli mit RNS-Phagen ist schon sechs Minuten nach Infektion eine "replicative form" nachweisbar. Die Synthese der "replicative form" erreicht nach 15 Minuten p.i. ihren Höhepunkt und läßt darauf wieder nach (BURDON et al. (1964)).

Genauere Untersuchungen der "replicative form" lassen vermuten, daß sie aus einer Doppelmatritze von zwei Virussträngen und einem neu im Entstehen begriffenen komplementären RNS-Strang besteht (BISHOP et al. (1965)).

Andere Autoren hingegen glauben, daß sich mehrere Einzelstränge an der "replicative form" angelagert finden. Nach ihrer Meinung handelt es sich hier entweder um neugebildete RNS-Stränge, die an der "replicative form" gebildet wurden, oder um RNS-Moleküle, die von einem komplementären Strang während der Synthese verdrängt wurden (ERIKSON et al. (1964)).

Eine weitere Version des Mechanismus der Virusreduplikation ist, daß ein Strang der "replicative form" kontinuierlich von einem im Wachsen begriffenen Tochterstrang verdrängt wird. Dieser Tochterstrang wiederum dient als Matritze für die Synthese eines neuen Einzelstranges, welcher dann aber Ribonuklease-empfindlich ist (FENWICK et al. (1964)).

Zur Frage des Entstehungsmechanismus der "replicative form" wurde folgendes Bild der Virus-RNS-Reduplikation bei der MS 2-RNS-Reduplikation entwickelt: Der in die Zelle eingebrachte

elterliche RNS-Strang (+Strang) des infizierenden Virus dient zunächst als m-RNS und programmiert die Synthese der RNS-Synthetase. Dieses neu gebildete Enzym bindet den parentalen +Strang, welcher dann die Matritze für die Synthese eines komplementären RNS-Stranges darstellt, des -Stranges. Damit ist die "replicative form" vollständig (WEISSMANN et al. (1963 d); (1964 b)).

Funktionstüchtige "replicative form" bildet nur +Stränge (WEISSMANN et al. (1963 d); (1964)). Ob es zur Synthese dieser neuen +Stränge eines weiteren Enzyms bedarf, ist noch nicht geklärt. Da die "replicative form" nur +Stränge synthetisiert, ergibt sich folgendes Problem:

Die elterliche Virus-RNS (ein+Strang) wird nicht in das neugebildete Tochtervirus eingebaut (DAVIS et al. (1963); ERIKSON et al. (1964)), und bleibt während des ganzen Virusreproduktionszyklus erhalten (DOI et al. (1963)). Es stellt sich nun die Frage, wie der elterliche +Strang von der "replicative form" entfernt wird (semikonservativer Mechanismus) bzw. ob er überhaupt entfernt wird (konservativer Mechanismus). Diese Frage ist noch nicht entschieden.

Es sei noch erwähnt, daß DAVIS et al. (1963), BROWN et al. (1965) weder den konservativen noch den semikonservativen Mechanismus für wahrscheinlich halten. BROWN et al. (1965) entwickeln die Hypothese, daß der -Strang in Ringform vorliegt, um welches das Enzym rotiert, wobei lange +Stränge gebildet werden, die später durch Enzyme in die richtigen Bruchstücke zerlegt werden.

5) Die Virusproteinsynthese

Die Bildung eines vollständigen Viruspartikels erfordert nicht nur die Neusynthese von RNS, sondern auch die Bildung

spezifischen Virusproteins.

Zur Virusproteinsynthese werden keine Zellproteine herangezogen, vielmehr erfolgt eine "de novo"-Synthese (DARNELL et al. (1960)). Die Synthese des Virusproteins erfolgt an den schon vor der Infektion vorhandenen Ribosomen (BRENNER et al. (1961); HASELKORN et al. (1964); ERIKSON et al. (1964); SUMMERS et al. (1965)). An diese lagern sich m-RNS Moleküle an. Als m-RNS dient der von der "replicative form" synthetisierte +Strang (MUNYON (1964)).

Als Quelle der zur Proteinsynthese benötigten Aminosäuren dient der intrazelluläre "Aminosäurepool" (DARNELL et al. (1960)).

6) Einfluß von Puromycin und AzaUracil auf die frühe Phase der Virusreproduktion

In den Mechanismus der Virusreproduktion wurde mit der RNS-Hemmsubstanz AzaUracil und dem Proteinsynthesehemmer Puromycin eingegriffen.

Die Inhibitorwirkung von AzaUracil und Puromycin auf die frühe Phase der Virusreproduktion wurde mit der Methode der Bestimmung der resistenten Perioden gemessen.

Eine resistente Periode setzt voraus, daß gewisse Stoffwechselprozesse im Virusreproduktionszyklus auch unter Inhibitoreinwirkung ablaufen können. Nach Entfernung des Inhibitors von den behandelten Kulturen sind diese nun in der Lage, den Vorgang der Virusreduktion in seiner Gesamtheit weiter ablaufen zu lassen. Die Zeit, die bis zum Auftreten des vollständigen infektiösen Viruspartikel vergeht, wird

davon abhängen, an welchem Punkt des Reproduktionszyklus der Inhibitor die Stoffwechselprozesse aufgehalten hat. Je später die Hemmsubstanz in diesen Ablauf eingreifen konnte, umso früher wird nach Entfernung des Inhibitors das ausgebildete Viruspartikel synthetisiert sein. (Näheres Kap. Ergebnisse)

a) Die Hemmwirkung von AzaUracil auf die frühe Phase der Virusreproduktion

AzaUracil in einer Konzentration von $6 \times 10^{-2}M$ hat eine resistente Periode von 2,2 Stunden zur Folge (Abb. 12), $9 \times 10^{-2}M$ von 2,0 (Abb. 10) bzw. 2,2 Stunden (Abb. 11). Eine Konzentrationsabhängigkeit in der frühen Phase der Virusreduplikation von der AzaUracilkonzentration und damit von der veränderten RNS-Synthese ist nicht feststellbar (Abb. 9 - 12). Die Proteinsynthese nicht-infizierter Zellen zeigt dagegen eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration des AzaUracils (Abb. 13).

Der katalytische Einfluß der freien Aminosäuren auf die RNS-Synthese wurde weiter oben erwähnt. Es wäre denkbar, daß die frühe Phase der Virusreproduktion durch einen zusätzlichen Mangel an Aminosäuren im umgebenden Nährmedium zusätzlich gehemmt wird. Das Resultat müßte eine gegenüber der alleini-gen RNS-Hemmung durch AzaUracil, verkürzte resistente Periode sein. Bei der Messung der resistenten Periode bei einer AzaUracilkonzentration von $9 \times 10^{-2}M$ ist eine resistente Periode von 2,0 bzw. 2,2 Stunden gefunden worden (Abb. 10 und 11). Bei einem Versuch mit gleicher Inhibitorkonzentration in aminosäurefreiem Medium beträgt die resistente Periode 1,8 Stunden (Abb. 9). Eine deutliche Verkürzung der resistenten Periode kann somit nicht festgestellt werden. Der Unterschied ist zu gering und liegt noch im Bereich der systembedingten Schwankungen. Zur Frage der katalytischen Wirkung

der Aminosäuren auf die RNS-Synthese kann somit durch dieses Versuchsergebnis nichts beigetragen werden.

b) Die Hemmwirkung von Puromycin auf die frühe Phase der Virusreproduktion

Wird in einer einheitlich angesetzten Zellkultur während eines Experimentes die frühe Phase der Virusreproduktion mit steigenden Puromycinkonzentrationen gehemmt, verkürzt sich entsprechend der Konzentrationszunahme die resistente Periode (DIEFENTHAL et al. (1967)). Eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der resistenten Periode bei Anwendung von 25 $\mu\text{g/ml}$ oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin konnte bei den hier durchgeführten Experimenten nicht gefunden werden (Abb. 9 bis 12). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß für jeden Versuch dieser Arbeit andere Zellansätze von Hühnerfibroblasten verwendet wurden.

Bei Anwendung des Proteininhibitors Puromycin ist die resistente Periode wesentlich kürzer als bei Anwendung von AzaUracil (Abb. 9 bis 12). AzaUracil unterbricht also den Virusreproduktionszyklus später als Puromycin. Dies beruht vermutlich darauf, daß die Virusreproduktion durch AzaUracil erst zu dem Zeitpunkt unterbrochen wird, zu dem eine erhöhte RNS-Synthese bei der Bildung großer Mengen neuer Virus-RNS benötigt wird. Dieser Zeitpunkt liegt nahe dem Ende der Latenzperiode. Puromycin dagegen hemmt bereits die Synthese einiger Frühproteine, deren Funktion frühzeitiger im Reproduktionszyklus erforderlich ist.

c) Kombinierte Anwendung von Puromycin und AzaUracil

Es sollte in diesen Experimenten geprüft werden, ob diejenige frühe Phase der Virusreproduktion, die resistent ist gegenüber der Einwirkung von Puromycin, durch zusätzliche Hemmung der RNS-Synthese mittels AzaUracil beeinflusst werden

kann. Diese Experimente sollten zur Klärung der Frage beitragen, warum mit Puromycin im Konzentrationsbereich von 15 $\mu\text{g/ml}$ bis 49 $\mu\text{g/ml}$ einerseits die Bildung nachweisbarer Frühproteine verhindert wird (FRANKLIN et al. (1962); BALTIMORE et al. (1963 b); EGGERS et al. (1963 b); TERSHAK (1964 b); SREEVALSAN et al. (1964); BEN-PORAT et al. (1965)), andererseits aber bei den gleichen Puromycinkonzentrationen eine deutliche resistente Periode beobachtet werden kann. (DIEFENTHAL et al. (1967)). Würde eine RNS-Synthese vor dem Auftreten der Frühproteine stattfinden, so könnte dieser Prozeß durch AzaUracil hemmbar sein. Dies würde zu einer Verkürzung derjenigen resistenten Perioden führen, die bei Anwendung von Puromycin allein zu beobachten ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, daß eine zusätzliche Hemmung der frühen Phase der Virusreproduktion bei gleichzeitiger RNS- und Proteininhibitorwirkung nicht auftritt. Die resistente Periode bei kombinierter Anwendung von Inhibitoren der Protein- und RNS-Synthese gleicht derjenigen, bei alleiniger Hemmung der Proteinsynthese (ABB. 9, 10 und 11).

Dieses Versuchsergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß die während der Frühphase der Virusreproduktion ablaufende RNS-Synthese durch AzaUracil nicht gehemmt wird. Dies könnte auf folgenden Mechanismen beruhen:

- a) Die restlichen 10 % RNS-Synthese, die auch unter AzaUracil noch verbleiben, reichen aus, um die Synthesevorgänge in der frühen Phase in Gang zu halten. Dies könnte mit der großen katalytischen Potenz der RNS erklärt werden.
- b) Die RNS-Synthese erfolgt während der frühen Phase der Virusreproduktion mit Bausteinen, die bereits in der Zelle vorliegen. So könnte angenommen werden, daß sich infolge der Blockierung der zelleigenen RNS-Polymerasen

durch ein Virus-induziertes Fröhenzym, zunächst ein Überschuß an vorsynthetisierten RNS-Bausteinen ansammelt. Die Virus-spezifischen Polymerasen könnten diese Bausteine nutzen.

- c) Darüberhinaus ist nicht auszuschließen, daß sich diese zwei Mechanismen addieren.

Das Vorhandensein einer resistenten Periode bei Anwendung von Inhibitoren der Proteinsynthese steht im Gegensatz zu Beobachtungen, nach denen die Entstehung von Frühproteinen durch gleich hohe Inhibitorkonzentrationen verhindert wird. Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte kein Anhalt dafür gefunden werden, daß während der Dauer der gegen Puromycin resistenten Periode eine RNS-Synthese stattfindet, die durch AzaUracil hemmbar ist. FRANKLIN et al. (1962) vermuten auf Grund ihrer Untersuchungen, daß im Anschluß an eine Mengovirusinfektion ein Frühprotein gebildet wird, das erst durch sehr hohe Konzentrationen ($100 \mu\text{g/ml}$) von Puromycin gehemmt werden kann. PENMAN (1965) verwandte $100 \mu\text{g/ml}$, BALTIMORE et al. (1963 c) $200 \mu\text{g/ml}$ Puromycin zur Inhibition von Fröhenzymen. Somit wäre es denkbar, daß der Entstehung der resistenten Periode die Bildung solcher schwer hemmbaren Frühproteine zugrunde liegt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die RNS-Synthese nicht-infizierter Zellen wird durch Aza-Uracil in Konzentrationen von $9 \times 10^{-2}M$ zu 90 % bis 95 % gehemmt. Die Proteinsynthese wird durch $9 \times 10^{-2}M$ AzaUracil um 62 % gehemmt.

Die Reproduktion von Vesicularstomatitis Virus wird durch die gleichen Konzentrationen um 99 % vermindert.

Die RNS-Synthese wird durch Puromycin in Konzentrationen von $100 \mu g/ml$ praktisch nicht gehemmt.

Die Proteinsynthese wird bereits durch $60 \mu g/ml$ Puromycin um 95 % vermindert.

Durch die kombinierte Anwendung von $6 \times 10^{-2}M$ AzaUracil und $20 \mu g/ml$ Puromycin wird die Proteinsynthese stärker gehemmt, und zwar gegenüber der alleinigen Anwendung des Puromycins zusätzlich um 5 %. Diese zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese kommt auch bei Anwendung steigender Inhibitorkonzentrationen zum Ausdruck.

Der Reproduktionszyklus von Vesikularstomatitis-Virus wird sowohl durch Puromycin, als auch durch AzaUracil gehemmt. Puromycin unterbricht den Ablauf der Virusreproduktion deutlich früher als AzaUracil.

Die kombinierte Anwendung beider Inhibitoren hat gegenüber der alleinigen Wirkung von Puromycin keinen zusätzlichen Einfluß auf die frühe Phase des Reproduktionszyklus. Erklärungen für diesen Befund werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

- ALEXANDER, H.E., KOCH, G., MOUNTAIN, I.M. and VAN DAMME, O.: Infectivity of RNA from poliovirus in human cell monolayers. *J. exptl. Med.* 108, 493-506 (1958 a).
- ALEXANDER, H.E., KOCH, G., MOUNTAIN, I.M., SPRUNT, K. and VAN DAMME, O.: infectivity of RNA of poliovirus on HeLa cell monolayers. *Virology* 5, 172-173 (1958 b).
- ALLEN, E.H. and SCHWEET, R.S.: Synthesis of haemoglobin in a cell-free system. I. Properties of the complete system. *J. biol. Chem.* 237, 760-767 (1962 a).
- ALLEN, E.H. and ZAMECNIK, P.C.: The effect of puromycin on rabbit reticulocyte ribosomes. *Biochi. Biophys. Acta* 55, 865-874 (1962 b).
- AMMANN, J., DELIUS, H. and HOFSCHEIDER, P.H.: Isolation and properties of an intact phage-specific replicative form of RNA phage M12. *J. MOL. Biol.* 10, 557-561 (1964).
- ARONSON, A.I. and SPIEGELMANN, S.: On nature of the ribonucleic acid synthesized in the presence of chloramphenicol. *Biochim. Biophys. Acta* 53, 84-95 (1961).
- AUGUST, J.T., COOPER, S. SHAPIRO, L. and ZINDER, N.D.: RNA phage induced RNA polymerase. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 28, 95-97 (1963).
- BAKER, B.R., SCHAUB, R.E., JOSEPH, J.P. and WILLIAMS, J.H.: Total synthesis of the antibiotic puromycin. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4044-4045 (1954).
- BALTIMORE, D.: In vitro synthesis of viral RNA by the poliovirus RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 51, 450-456 (1964).
- BALTIMORE, D. and FRANKLIN, R.M.: The effect of mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 48, 1383-1390 (1962 a).
- BALTIMORE, D. and FRANKLIN, R.M.: Preliminary data on a virus-specific enzyme system responsible for the synthesis of viral RNA. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 9, 388-392 (1962b).

- BALTIMORE, D. and FRANKLIN, R.M.: Effects of puromycin and p-FPA on mengovirus RNA and proteinsynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 431-441 (1963 a).
- BALTIMORE, D. and FRANKLIN, R.M.: Properties of the mengovirus and poliovirus RNA polymerase. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.* 28, 105-108 (1963 b).
- BALTIMORE, D., FRANKLIN, R.M. and CALLENDER, J.: Mengovirus - induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 425-430 (1963 c).
- BALTIMORE, D., BECKER, S. and DARNELL, J.E.: Virus-specific double-stranded RNA in poliovirus-infected cells. *Science* 143, 1034-1036 (1964).
- BEN-ISHAI, R. and VOLCANI, B.E.: Dependence of protein synthesis on ribonucleic acid formation in a thymine-requiring mutant of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 265-270 (1956).
- BEN-PORAT, T. and KAFLAN, A.S.: Mechanism of inhibition of cellular DNA synthesis by pseudorabies virus. *Virology* 25, 22-29 (1965).
- BISHOP, J.M., SUMMERS, D.F. and LEVINTOW, L.: Characterization of ribonuclease-resistant RNA from poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 54, 1273-1281 (1965).
- BRENNER, S., JACOB, F. and MESSELSOHN, M.: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190, 576-581 (1961).
- BROWN, F. and MARTIN, S.J.: A new model for virus ribonucleic acid replication. *Nature* 208, 861-863 (1965).
- BRUEMMER, N.C., HOLLAND, J.F. and SHEEHY, P.R.: Drug effects on a target metabolic pathway and on mouse tumor growth: AzaUridine and decarboxylation of crotonic acid-7-C14. *Cancer Res.* 22, 113-119 (1962).
- BURDON, R.H., BORET, P. and WEISSMANN, C.: Involvement of double-stranded RNA in the replication of MS2 phage. *Feder. Proc.* 23, 319 (1964).
- CLARK, J.M. and CHANY, A.Y.: Inhibitors of the transfer of amino acid from amino acyl soluble ribonucleic acid to proteins. *J. biol. Chem.* 240, 4734-4739 (1965).

- COOPER, S. and ZINDER, N.D.: The growth of an RNA bacteriophage: The role of DNA synthesis. *Virology* 18, 405-411 (1962).
- CREASLER, E.H.: The induced (adaptive) biosynthesis of β -galactosidase in *Staphylococcus aureus*. *J. gen. Microbiol.* 12, 288-297 (1955).
- DARNELL, J. E. and LEVINTOW, L.: Poliovirus protein: Source of amino acids and time course of synthesis. *J. biol. Chem.* 235, 74-77 (1960).
- DAVIS, J.E. and SINSHEIMER, R.L.: The replication of bacteriophage MS2. 1. Transfer of parental nucleic acid to progeny phage. *J. Mol. Biol.* 6, 203-207 (1963).
- DE DENKEN-GREUSON, M.: Synthèse des protéines et vitesse de renouvellement du phosphore de l'acide ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 560-569 (1953).
- DIEFENTHAL, W. und Habermehl, K.O.: Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Monolayer-Gewebekulturen in Petrischalen. *Zbl. Bakt. I Orig.* 185, 11-13 (1962).
- DIEFENTHAL, W. und HABERMEHL, K.O.: Untersuchungen über eine frühe Phase der Virusreproduktion. Nachweis einer Resistenz gegenüber dem Einfluß verschiedener Inhibitoren. *Zbl. Bakt. I Orig.* 198, 331-371 (1965).
- DIEFENTHAL, W., HABERMEHL, K.O. und HARTTMANN, U.: Untersuchungen über den Ablauf der Proteinsynthese während der Frühphase der Virusreproduktion. *Zbl. Bakt. I Orig.* 204, 55-79 (1967).
- DOI, R.H. and SPIEGELMANN, S.: Homology test between the nucleic acid of an RNA virus and the DNA in the host cell. *Science* 138, 1270-1272 (1962).
- DOI, R.H. and SPIEGELMANN, S.: Conservation of a viral RNA genome during replication and translation. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 49, 353-360 (1963).
- DULBECCO, R. and VOGT, M.: Plaqueformation and isolation of pure lines with poliomyelitisvirus. *J. exptl. Med.* 99, 167-182 (1954).
- EAGLE, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-504 (1955).

- EGGERS, H.J. and TAMM, I.: On the mechanism of selective inhibition of enterovirus multiplication by 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole. *Virology* 18, 426-438 (1962).
- EGGERS, H.J. and TAMM, I.: Inhibition of enterovirus ribonucleic acid synthesis by 2-(α -hydroxybenzyl)benzimidazole (HBB). *Nature* 197, 1327-1328 (1963 a).
- EGGERS, H.J., BALTIMORE, D. and TAMM, I.: The relation of protein synthesis to formation of poliovirus RNA polymerase. *Virology* 21, 281-283 (1963 b).
- ENNIS, H.L. and LUBIN, M.: Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells, *Science* 146, 1474-1476 (1964).
- ERIKSON, R.L., FENWICK, M.L. and FRANKLIN, R.M.: Replication of bacteriophage RNA: Studies on the fate of parental RNA. *J. Mol. Biol.* 10, 519-529 (1964).
- FALLON, H.J. and FREI III, E.: Clinical and biochemical effect of 6-azauridine in leukemia. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 3, 224 (1961).
- FARNHAM, A.E.: Effect of aminonucleoside on normal and encephalomyocarditis virus-infected L-cells. *Virology* 27, 73-79 (1965).
- FENWICK, M.L.: The influence of poliovirus infection on RNA synthesis in mammalian cells. *Virology* 19, 141-149 (1963).
- FENWICK, M.L., ERIKSON, R.L. and FRANKLIN, R.M.: Replication of the RNA of bacteriophage R17. *Science* 146, 527-530 (1964).
- FRANKLIN, R.M. and BALTIMORE, D.: Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 27, 175-195 (1962).
- GALE, E.F. and FOLKES, J.P.: The assimilation of amino acids by bacteria. 15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 53, 493-498 (1953).
- GALE, E.F. and FOLKES, J.P.: The assimilation of amino acids by bacteria. 21. The effect of nucleic acids on the development of certain enzymic-activities in disrupted staphylococcal cells. *Biochem. J.* 59, 675-684 (1955).

GROS, F. et GROS, F.: Role des acides amines dans la synthese des acides nucleiques chez E.coli. J. exptl. Cell Res. 14, 104-131 (1958).

HABERMANN, V.: The effect of 6-azauracil on microorganisms inhibited by chloramphenicol. Biochim. Biophys. Acta 49, 204-211 (1961).

HAHN, F.E., SCHAECHTER, M., CEGLOWSKI, W.S., HOPPS, H.E. and CIAK, I.: Interrelation between nucleic acid and protein biosynthesis. II Synthesis and fate of bacterial nucleic acids during exposure to, and recovery from the action of chloramphenicol. Biochim. Biophys. Acta 26, 469-476 (1957).

HAKALA, M.T., LAW, L.W. and WELCH, A.D.: Inhibitory activity of 6-azauracil, 6-uracil-methyl sulfons and related compounds on the growth of mouse lymphomas and sarkoma 180. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 113 (1956).

HANDSCHUMACHER, R.E.: Metabolites of 6-azauracil formed by Strept. faecalis. Feder. Proc. 16, 191 (1957 a).

HANDSCHUMACHER, R.E.: Studies of bacterial resistance to 6-azauracil and its riboside. Biochim. Biophys. Acta. 23, 428-430 (1957 b).

HANDSCHUMACHER, R.E. and WELCH, A.D.: Microbial studies of 6-azauracil, an antagonist of uracil. Cancer Res. 16, 965-969 (1956).

HANDSCHUMACHER, R.E. and PASTERNAK, C.A.: Inhibition of orotidylic acid decarboxylase, a primary site of carcinostasis by 6-azauracil. Biochim. Biophys. Acta 30, 451-452 (1958).

HARUNA, I., NOZU, K., OHTAKA, Y. and SPIEGELMANN, S.: An RNA "replicase" induced by and selective for a viral RNA: Isolation and properties. Proc. Nat. Acad. Sci., US 50, 905-911 (1963).

HASELKORN, R. and FRIED, V.A.: Cell-free protein synthesis: The nature of the active complex. Proc. Nat. Acad. Sci., US 51, 308-315 (1964).

HAYWOOD, A.N. and SINSHEIMER, R.L.: Inhibition of protein synthesis in E. coli protoplasts by actinomycin-D. J. Mol. Biol. 9, 247-249 (1963).

- HOFSCHEIDER, P.H.: Untersuchungen über "kleine" E.coli K12 Bacteriophagen. 2.Mitt.: Versuche über die DNS-Abhängigkeit der Vermehrung der RNS-Phagen M12. Ztschr. Naturforschg. 18 b, 205-210 (1963).
- HOLLAND, J.J.: Inhibition of DNA-primed RNA synthesis during poliovirus infection of human cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 556 (1962).
- HURWITZ, J., FURTH, J.J., MALAMY, M. and ALEXANDER, M.: The role of DNA in RNA synthesis. III The inhibition of the enzymatic synthesis of RNA and DNA by actinomycin D and proflavin. Proc. Nat. Acad. Sci., US 48, 1222-1229 (1962).
- KAERNER, H.C. and HOFFMANN-BERLING, H.: Synthesis of double-stranded RNA in RNA-phage infected E. coli cells. Nature 202, 1012-1013 (1964).
- KELLY, R.B. and SINSHEIMER, R.L.: A new RNA component in MS2-infected cells. J. Mol. Biol. 8, 602-605 (1964).
- KWAMATA, J. and IMANISHI, M.: Interaction of actinomycin with deoxyribonucleic acid. Nature 187, 1112-1113 (1960).
- LEVINTHAL, C. KEYNAN, A. and HIGA, A.: Messenger RNA turnover and protein synthesis in B. subtilis inhibited by actinomycin D, Proc. Nat. Acad. Sci., US 48, 1631-1638 (1962).
- LEWINTOW, L., THOREN, M.M., DARNELL, J.E., and HOOPER, J.L.: Effect of p-fluorophenylalanine and puromycin on the replication of poliovirus Virology 16, 220-229 (1962).
- LODISH, H.F., COOPER, S. and ZINDER, N.D.: Host-dependent mutants of the bacteriophage f2. IV. On the biosynthesis of a viral RNA polymerase. Virology 24, 60-70 (1964).
- MARKHAM, R.: Lethal synthesis. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 8, 163-177 (1958).
- MELNIK, I., CANTAROW, A. and PASCHKIS, K.E.: Effect of certain uracil analogs on incorporation of uracil into RNA. Arch. Biochem. Biophys. 74, 281-283 (1958).

- MONTAGNIER, L. and SANDERS, F.K.: Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. *Nature* 199, 664-667 (1963).
- MORRIS, A.J. and SCHWEET, R.S.: Release of soluble protein from reticulocyte ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 47, 415-416 (1961).
- MUNYON, W.: Inhibition of poliovirus by 2,6-diaminopurine. *Virology* 22, 15-22 (1964).
- NATHANS, D.: Puromycin inhibition of protein synthesis: Incorporation of puromycin into peptide chains. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 51, 585-592 (1964).
- NATHANS, D. and LIPMANN, F.: Amino acid transfer from aminoacylribonucleic acids to protein on ribosomes of *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 47, 497-504 (1961).
- NATHANS, D., V.EHRENSTEIN, G., MONRO, R. and LIPMANN, F.: Protein synthesis from aminoacyl-soluble ribonucleic acid. *Feder. Proc.* 21, 127-133 (1962).
- NEIDHARDT, F.C.: Properties of a bacterial mutant lacking amino acid control of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 365-379 (1963).
- NEIDHARDT, F.C. and EIDLIC, L.: Charakterization of the RNA formed under conditions of relaxed amino acid control in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 380-388 (1963).
- OTSUJI, N. and TAKAGI, Y.: Effect of 6-azauracil on cells and subcellular preparations of *E. coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* 46, 791-798 (1959).
- PARDEE, A.B.: Nucleic acid precursors and protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 40, 263-270 (1954).
- PARDEE, A.B. and PRESTIDGE, L.S.: The dependence of nucleic acid synthesis on the presence of amino acids in *E. coli*. *J. Bact.* 71, 677-683 (1956).
- PARDEE, A.B. and PRESTIDGE, L.S.: A requirement for pyrimidines in the first few minutes of T2 bacteriophage development. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 544-546 (1960).

- PASTERNAK, C.A. and HANDSCHUMACHER, R.E.: The biochemical activity of 6-azauridine: Interference with pyrimidine metabolism in transplantable mouse tumors. *J. biol. Chem.* 234, 2992-2997 (1959).
- PENMAN, S.: Stimulation of the incorporation of choline in poliovirus-infected cells. *Virology* 25, 148-152 (1965).
- RABINOWITZ, M. and FISHER, J.M.: A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. *J. biol. Chem.* 237, 477-481 (1962).
- RADA, B. and BLASKOVIC, D.: Inhibition of vaccinia virus multiplication in vitro by 6-azauracil riboside. *Acta virol.* 5, 308-316 (1961).
- RADA, B. and BLASKOVIC, D.: Some characteristics of the effect of 6-azauridine on vaccinia virus multiplication, in composition with those of 5-iododeoxyuridine. *Acta virol.* 10, 1-9 (1966).
- RALPH, R.K., MATTHEWS, R.E.F., MATUS, A.J. and MANDEL, H.G.: Isolation and properties of double-stranded viral RNA from virus-infected plants. *J. Mol. Biol.* 11, 202-212 (1965).
- REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. and TATUM, E.L.: Effect of AD on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science* 134, 556-557 (1961).
- REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. and TATUM, E.L.: Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 48, 1238-1245 (1962).
- ROBY, R., TESKEY, C. and HOULIKAN, R.B.: Inhibition of plaque formation by myxoma and fibroma viruses with pyrimidine analogues. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 120, 496-500 (1965).
- RUBIN, R.J., JAFFE, J.J. and HANDSCHUMACHER, R.E.: Qualitative differences in the pyrimidine metabolism of *Trypanosoma equiperdum* and mammals as characterized by 6-azauracil and 6-azauridine. *Biochem. Pharmacol.* 11, 563-572 (1962).
- SALZMAN, N.P., LOCKART, R.Z. and SEBRING, E.D.: Alteration in HeLa cell metabolism resulting from poliovirus infection. *Virology* 9, 244-259 (1959).

- SANDERS, F.K.: Role of infective nucleic acid in the production of encephalomyocarditis virus. *Nature* 185, 802-804 (1960).
- SÄNGER, H.L. and KNIGHT, C.A.: Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus-infected tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 13, 455-461 (1963).
- SCHINDLER, R. and WELCH, A.D.: Ribosidation as a means of activating 6-azauracil as an inhibitor of cell reproduction. *Science* 125, 548-549 (1957).
- SHATKIN, A.J.: Actinomycin inhibition of ribonucleic acid synthesis and poliovirus infection of HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* 61, 310-313 (1962).
- SHATKIN, A.J., REICH, E., FRANKLIN, R.M. and TATUM, E.L.: Effect of mitomycin on mammalian cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 277-289 (1962).
- SHIPP, W. and HASELKORN, R.: Double-stranded RNA from tobacco leaves infected with TMV. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 52, 401-408 (1964).
- SIMON, E.H.: Evidence for the nonparticipation of DNA in viral RNA synthesis. *Virology* 13, 105-118 (1961).
- SKODA, J. and SORM, F.: Antagonism between 6-azauracil and certain pyrimidine derivatives in *E. coli*. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 21, 1328-1331 (1956).
- SKODA, J., HESS, V.F. and SORM, F.: The biosynthesis of 6-azauracil riboside by *E. coli* growing in the presence of 6-azauracil. *Experientia* 13, 150-151 (1957).
- SKODA, J. and SORM, F.: Accumulation of nucleic acid metabolites in *E. coli* exposed to the action of 6-azauracil. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 659-660 (1958).
- SORM, F. and SKODA, J.: 6-azauracil, an antimetabolite of uracil and cytosine in *E. coli*. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 21, 487-488 (1956 a).
- SORM, F., JAKUBOVIC, A. and SLECHTA, L.: The anticancerous action of 6-azauracil (3,5 - dioxo - 2,3,4,5 - tetrahydro - 1,2,4 - triazine). *Experientia* 12, 271-272 (1956 b).

- SPIEGELMANN, S. and DOI, R.H.: Replication and translation of RNA genomes. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 28, 109-116 (1963).
- SREEVALSAN, T. and LOCKART, R.Z.: Inhibition by puromycin of the initiation of synthesis of infectious RNA and virus by chicken embryo cells infected with western equine encephalomyelitis virus. Virology 24, 91-96 (1964).
- STERN, J.L., SEKIGUCHI, M., BARNER, H.D. and COHEN, S.S.: The synthesis of messenger RNA without protein synthesis. I. Studies with thymineless strains of E. coli. J. Mol. Biol. 8, 629-637 (1964).
- STEUT, G.S. and BRENNER, S.: A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci., US 47, 2005-2014 (1961).
- SUMMERS, D.F. and LEVINTOW, L.: Constitution and function of polyribosomes of poliovirus-infected HeLa cells. Virology 27, 44-53 (1965).
- TAKAGI, Y. and OTSUJI, N.: Studies on the mechanism of action of 6-azauracil. Biochim. Biophys. Acta 29, 227-228 (1958).
- TAKEDA, Y., HAYASHI, S., NAKAGAWA, H. and SUZUKI, F.: The effect of puromycin on ribonucleic acid and protein synthesis. J. Biochem. (Tokyo) 48, 169-177 (1960).
- TERSHAK, D.R.: Effect of 5-fluorouracil on poliovirus growth. Virology 24, 262-269 (1964 a).
- TERSHAK, D.R.: A study of protein synthesized during the eclipse phase of poliovirus growth: An ultraviolet light and puromycin analysis. Virology 23, 1-9 (1964 b).
- WALLER, C.W., FREYTH, P.W., HUTCHINGS, B.L. and WILLIAMS, J.H.: Achomycin. The structure of the antibiotic puromycin. J. Am. Chem. Soc. 75, 2025 (1953).
- WARNER, J.R., MADDEN, M.J. and DARNELL, J.E.: The interaction of poliovirus RNA with E. coli ribosomes. Virology 19, 393-399 (1963).

- WECKER, E.: Effect of puromycin on the replication of western equine encephalitis and poliomyelitis viruses. *Nature* 197, 1277-1279 (1963).
- WECKER, E. and SCHONNE, E.: Inhibition of viral RNA synthesis by parafluorophenylalanine. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 47, 278-282 (1961).
- WEISSMANN, C., SIMON, L. and OCHOA, S.: Induction by an RNA phage of an enzyme synthesizing RNA. *Feder. Proc.* 22, 463 (1963 a).
- WEISSMANN, C., SIMON, L. and OCHOA, S.: Induction by an RNA phage of an enzyme catalyzing incorporation of ribonucleotides into RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 49, 407-414 (1963 b).
- WEISSMANN, C., SIMON, L., BORST, P. and OCHOA, S.: Induction of RNA-synthetase in *E. coli* after infection by the RNA phage MS2. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.* 28, 99-104 (1963 c).
- WEISSMANN, C. and BORST, P.: Double-stranded ribonucleic acid formation in vitro by MS2 phage-induced RNA synthetase. *Science* 142, 1188-1191 (1963 d).
- WEISSMANN, C., BORST, P., BURDON, R.H., BILLETER, M.A. and OCHOA, S.: Replication of viral RNA, II. Double-stranded replicative form of MS2 phage RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 51, 682-690 (1964 a).
- WEISSMANN, C., BORST, P., BURDON, R.H., BILLETER, M.A. and OCHOA, S.: Replication of viral RNA, IV. Properties of RNA synthetase and enzymatic synthesis of MS2 phage RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 51, 890-897 (1964 b).
- WEISSMANN, C., BILLETER, M.A., SCHNEIDER, M.C., KNIGHT, C.A. and OCHOA, S.: Replication of viral RNA, VI. Nucleotide composition of the replicative form of tobacco mosaic virus RNA and of its component strands. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 52, 653-656 (1965).
- WETTSTEIN, F.O., NOLL, H. and PENMAN, S.: Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 87, 525-528 (1964).

- WHEELOCK, E.F.: The role of protein synthesis in the eclipse period of Newcastle disease virus multiplication in HeLa cells as studied with puromycin. Proc. Nat. Acad. Sci., US 48, 1358-1366 (1962).
- WHITE, D.O. and CHEYNE, J.M.: Stimulation of Sendai virus multiplication by puromycin and actinomycin D. Nature 208, 813-814 (1965 a).
- WHITE, D.O., DAY, H.M., BATCHELDER, E.J., CHYNE, J.M. and WANSBROUGH, A.J.: Delay in the multiplication of influenza virus. Virology 25, 289-302 (1965 b).
- WILLIAMSON, A.R. and SCHWEET, R.: Role of the genetic message in initiation and release of the polypeptide chain. Nature 202, 435-437 (1964).
- WISSEMAN, C.L., HAHN, F.E., HOPPS, H. and SMADEL, J.E.: Chloramphenicol inhibition of protein synthesis. Feder. Proc. 12, 466 (1953).
- YARMOLINSKY, M.B. and DE LA HABA, G.L.: Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. Proc. Nat. Acad. Sci., US 45, 1721-1729 (1959).
- ZIMMERMANN, E.F., HEETER, M. and DARNELL, J.E.: RNA synthesis in poliovirus infected cells. Virology 19, 400-408 (1963).

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Diefenthal danke ich für Überlassung des Themas und Unterstützung bei der Ausarbeitung, Herrn Priv. Doz. Dr. K. O. Habermehl für Anregungen, die er mir zur Durchführung der Arbeit gab. Mein Dank gilt auch den medizinisch technischen Assistentinnen Frau E. John, Fräulein H. Voss und Fräulein G. Kroschel, die mir bei den virologischen Versuchen mit ihrem Rat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Am 1. November 1937 wurde ich als Sohn des damaligen Regierungsassessors, jetzigen verstorbenen Ministerialdirektors, Dr.jur. Günter Schelp und seiner Ehefrau Irene geb. Seifert in Berlin geboren.

Am 9. März 1960 bestand ich die Abschlußprüfung an der Wirtschaftsoberschule der Stadt Bonn und am 17. April 1961 eine Ergänzungsprüfung zur Erlangung der vollen Hochschulreife. Im Sommer-Semester 1961 begann ich mein Medizinstudium zunächst in Bonn, und ab Winter-Semester 1961/62 studierte ich an der Freien Universität Berlin.

Am 10. April 1962 bestand ich das Vorphysikum, am 20. März 1964 das Physikum, und am 22. September 1967 beendete ich das Medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

